

UNTERSUCHUNGEN
ZUR PROTEOLYTISCHEN WIRKUNG
DER PROTEASE DES MAUL-
UND KLAUENSEUCHEVIRUS:
ETABLIERUNG
EINES MODELLSYSTEMS IN E. COLI

Wolfgang Klump



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554610_0037

UNTERSUCHUNGEN ZUR PROTEOLYTISCHEN WIRKUNG
DER PROTEASE DES MAUL- UND KLAUENSEUCHEVIRUS:
ETABLIERUNG EINES MODELLSYSTEMS IN E. COLI

Dissertation

Fakultät für Chemie und Pharmazie
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Wolfgang Klump
aus Berlin

München, 1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Zillig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Februar 1986

Meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Abteilung Virusforschung unter der Leitung von Professor Dr. Dr. Peter Hans Hofschneider durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. P. H. Hofschneider danke ich für die Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker danke ich für die Vertretung der Arbeit vor der Fakultät.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. O. Marquardt für seine Anteilnahme, Kritik und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Mein Dank gilt auch den Studenten Jochen Reiß, Jörg Soppa und Sabine Werner, welche jeweils 6 Wochen an diesem Projekt mitgearbeitet und wertvolle Hilfe geleistet haben.

Für technische Hilfe danke ich Frä. M. Kauzmann, Frä. M. Wechsler und Frä. H. Pilgram.

INHALTSVERZEICHNIS

A ZUSAMMENFASSUNG	5
B EINLEITUNG	7
1. Aufbau und Genomorganisation des MKSV	8
2. RNA-Replikation und Proteinsynthese von MKSV	9
2.1 RNA-Replikation	10
2.2 Virus-spezifische Proteinsynthese	11
2.3 Prozessierungsschema des viralen Polyproteins	13
3. Untersuchung der limitierten Proteolyse des viralen Polyproteins in Abhängigkeit von der MKSV-spezifischen Protease	16
4. Regulierbare Expression MKSV-spezifischer Proteinsequenzen in <u>E. coli</u>	18
C ERGEBNISSE	24
1. IDENTIFIZIERUNG DES MKSV-SPEZIFISCHEN EXPRESSIONSPRODUKTES VON pVP1-56c	24
1.1 Nachweis von Peptiden mit VP1-spezifischen Antigendeterminanten in Bakterienextrakten mittels ELISA	24
1.2 Molekulargewichtsbestimmung des VP1-spezi- fischen Expressionsproduktes von pVP1-56c	27
2. NACHWEIS MKSV-SPEZIFISCHER PROTEASEAKTIVITÄT IN <u>E. COLI</u> UND BESTIMMUNG DES GENORTES DER VIRALEN PROTEASE	30
2.1 Konstruktion der Plasmide pVP1-52 und pVP1-56c Δ	31
2.2 MKSV-spezifische Expressionsprodukte von pVP1-52 und pVP1-56c Δ	33
2.2 Genort der MKSV-spezifischen Protease	35
2.3 Suche nach weiteren Spaltprodukten	35

3. EXKURS: BAKTERIOTOXIZITÄT MKSV-SPEZIFISCHER PROTEINE	40
3.1 Einfluß MKSV-spezifischer Expressions- produkte auf das Bakterienwachstum	40
3.2 Verlauf der Lebendkeimzahl und Revertanten- rate der Bakterien in Abhängigkeit von der Expression MKSV-spezifischer Proteine	43
4. HEMMUNG DER MKSV-SPEZIFISCHEN PROTEASE	47
4.1 Hemmung der viralen Protease mit Zn^{2+} -ionen	47
4.2 Zn^{2+} -ionen beeinflussen die Bakterio- toxizität der viralen Protease	50
5. EINFLUSS BENACHBARTER GENPRODUKTE AUF DIE PROTEASEAKTIVITÄT	52
5.1 Konstruktion der Plasmide pVP1-Pol und pVP1- Δ BglIII-Pol	52
5.2 MKSV-spezifische Expressionsprodukte von pVP1-Pol und pVP1- Δ BglIII-Pol	53
6. SPALTUNG EINES UNABHÄNGIG SYNTHETISIERTEN SUBSTRATS DURCH DIE VIRALE PROTEASE	56
7. AUSBAU DES PROZESSIERUNGSSYSTEMS	60
7.1 Konstruktion der Plasmide pPLVP3 und pVP3-Pol	61
7.2 MKSV-spezifische Expressionsprodukte von pPLVP3 und pVP3-Pol	63
D DISKUSSION	73
1. Expression MKSV-spezifischer Proteine in <u>E. coli</u> und Nachweis der MKSV-spezifischen Proteaseaktivität	73
2. Genort der MKSV-Protease	76
3. Zur Bakteriotoxizität MKSV-spezifischer Expressionsprodukte	77
4. Identifizierung der bei der Prozessierung auftretenden Spaltprodukte	79
4.1 Nachweis der Spaltprodukte	79
4.2 Kartierung der MKSV-spezifischen Spaltprodukte	81

5. Stellt das entwickelte Prozessierungssystem ein brauchbares Modell zur Untersuchung der limitierten Proteolyse des viralen Polyproteins dar?	84
---	----

E MATERIAL UND METHODEN	92
-------------------------	----

1. Material	92
1.1 Verwendete Chemikalien und Enzyme	92
1.2 Bakterienstämme, Plasmide	94
1.3 Kulturmedien und wichtige Puffer	94
1.4 Sonstiges	95
2. Methoden	96
2.1 Plasmidisolierung	96
2.1.1 Präparative Isolierung	96
2.1.2 Minipräparation	97
2.2 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	98
2.3 Agarose-Gelelektrophorese	98
2.4 DNA-Fragmentisolierung	99
2.5 Abspaltung der 5'-Phosphate mit alkalischer Phosphatase	100
2.6 Auffüllen von 5'-überstehenden Enden	101
2.7 Ligase-Reaktionen	101
2.8 Herstellung kompetenter Zellen	102
2.9 Transformation von Bakterien	102
2.10 Nick-Translation	103
2.11 TCA-Fällung von DNA	104
2.12 <u>in situ</u> -Koloniehybridisierung	104
2.13 Temperaturinduzierte Expression	106
2.14 Zellyse	107
2.15 Isolierung MKSV-spezifischer Fusionsproteine von pPLVP1 und pPLVP3 aus Bakterienlysaten	108
2.16 Proteinkonzentrationsbestimmung	109
2.17 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	109
2.18 Immunologische Methoden	111
2.18.1 Immunoblot	111
2.18.2 ELISA	113

2.18.3 Immunisierung von Kaninchen	115
2.19 ^{14}C -Markierung von p_L -abhängig exprimierten Proteinen	115
2.20 Fluorographie	116
2.21 TCA-Fällung von Proteinen	116
2.22 Arbeiten mit rekombinanten Plasmiden	117
 F LITERATURVERZEICHNIS	 118
 G ABKÜRZUNGEN	 129

A ZUSAMMENFASSUNG

Das RNA-Genom des MKSV weist einen langen offenen Leserahmen auf, der für ein 260 kDa-Polyprotein kodiert. Nach Translation wird das Polyprotein postribosomal über Zwischenstufen zu den reifen Virusproteinen prozessiert. An diesem Prozeß sind Proteasen der infizierten Wirtszelle und eine viruskodierte Protease beteiligt. Um die Rolle der viralen Protease beim Abbau des Polyproteins zu studieren, wurde ein Prozessierungssystem in E. coli etabliert, in welchem die virale Protease getrennt von den zellulären Proteasen ihre spezifische Aktivität entfalten kann.

In einem Expressionsplasmid wurde der MKSV-spezifische Leserahmen stufenweise verlängert, so daß ein immer größerer Anteil des viralen Polypeptids exprimiert werden konnte.

Die virale Protease wurde als Bestandteil eines der exprimierten Polyproteine identifiziert. Sie ist enzymatisch aktiv und katalysiert die spezifische Proteolyse dieses Polyproteins.

Weitere Konstruktionen mit nun wiederum verkürztem Leserahmen zeigten diese Spaltung nicht. Durch Vergleich verschiedener Konstruktionen konnte die für die Protease kodierende cDNA-Sequenz auf der Genkarte des MKSV lokalisiert und das Virusprotein P20b als Protease identifiziert werden.

Das etablierte Prozessierungssystem wurde benutzt, um die proteolytische Spaltung des viralen Polyproteins in Abhängigkeit von der viralen Protease zu untersuchen. Es wurde gezeigt, daß die virale Protease u. a. zwischen den Virusproteinen VP3 und VP1 als auch zwischen VP1 und P12 spaltet. Im jeweiligen Spaltbereich befindet sich aber keine Glu/Gly-Sequenz, welche nach Forss et al. (1984) die preferentielle Spaltsequenz der viralen Protease darstellen soll. Dagegen kann die Spaltung des Polyproteins inmitten

der VP3-Domäne durch die Erkennung einer dort befindlichen Glu/Gly-Sequenz erklärt werden. Die MKSV-spezifische Protease erkennt somit verschiedene primäre Spaltsequenzen.

Bislang wurde aus in vitro-Translationsexperimenten geschlossen, daß die Spaltung zwischen VP1 und P12 von einer Protease der Wirtszelle katalysiert wird (Burroughs et al., 1984). Es kann nunmehr angenommen werden, daß die Prozessierung des viralen Polyproteins unabhängig von dieser Wirtszellprotease ablaufen kann.

Die Konstruktionen mit Proteaseaktivität zeigen gleichzeitig auch einen toxischen Effekt auf E. coli-Zellen. Die toxische Wirkung konnte durch Hemmung der enzymatischen Aktivität der Protease mittels Zinkionen aufgehoben werden. Die Korrelation zwischen proteolytischer Aktivität und der Toxizität erlaubt den Schluß, daß neben dem viralen Polyprotein auch virusfremde Proteine von der viralen Protease abgebaut werden können.

B EINLEITUNG

Die Maul- und Klauenseuche (MKS) ist eine Viruserkrankung, die bei Paarhufern auftritt - am häufigsten bei Rindern, Schweinen, Ziegen und Schafen - und die wegen ihrer hohen Morbidität und schnellen Ausbreitung verheerende Auswirkungen auf die Nutztierhaltung hat.

Das Maul- und Klauenseuchevirus (MKSV) wird bei der Nahrungsaufnahme, durch den direkten Kontakt oder durch die Luft übertragen.

Im infizierten Tier setzt sich das MKSV bevorzugt in epitheliale Gewebe fest, bei Rindern besonders in den Epithelien der Zunge und der Klauen, und bewirkt dort die Zerstörung des Gewebes. Symptomatisch für das Krankheitsbild sind der durch die beeinträchtigte Nahrungsaufnahme bedingte Gewichtsverlust und die durch nachfolgende Wundinfektionen an den Klauen hervorgerufene Lahmheit. Während erwachsene Tiere die Krankheit im Normalfall überstehen, tritt bei Jungtieren eine Sterblichkeitsrate bis zu 50% auf (Bachrach, 1968). Nach Abklingen der Krankheitssymptome bleiben die befallenen Tiere monatelang Keimträger und stellen eine potentielle Quelle für ein erneutes Aufflackern der Seuche dar (Brooksby, 1982).

Nach der Entdeckung des Erregers der MKS durch Loeffler und Frosch im Jahre 1897 lag das Hauptinteresse anfangs in der Charakterisierung und Strukturaufklärung des Erregers, dem Studium seiner immunogenen Eigenschaften und der Entwicklung von Verfahren zu seiner Züchtung. Erst nachdem die Vermehrung des MKSV in Zellkultur etabliert worden war (Sellers, 1955; Brown & Cartwright, 1963), konnte die Virusreplikation als auch die Wechselwirkung zwischen Virus und Wirtszelle studiert werden. Die vor kurzem gelungene Klonierung und Sequenzierung des größten Teils des MKSV-Genoms (Küpper et al., 1981) eröffnete neue Möglichkeiten, um die Genomorganisation und die Funktion der

einzelnen Virusgene zu untersuchen.

1. Aufbau und Genomorganisation des MKSV

Das MKSV ist ein ikosaedrisches Partikel mit einem Molekulargewicht von $6,9 \times 10^9$ und einem Durchmesser von 25 nm. Seine Proteinhülle ist aus je 60 Kopien vier verschiedener Virusproteine, VP1 bis VP4, aufgebaut (Talbot und Brown, 1972) und enthält als Virusgenom eine polyadenylierte (+)-Strang RNA von 8 kb (Rekosh, 1977). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde das MKSV der Gruppe der Picornaviren zugeordnet, zu der auch die Enteroviren, Cardioviren und Rhinoviren zählen (Cooper et al., 1978).

Man hat sieben verschiedene Serotypen des MKSV entdeckt, die sich in mehr als 60 Subtypen unterteilen lassen. Diese immunogene Variabilität wird durch die hohe Mutationsrate in den Genen der Hüllproteine, insbesondere des VP1, bewirkt (Marquardt, 1982; Beck et al., 1983). Das Hüllprotein VP1 ist auf der Oberfläche der Virushülle exponiert und stellt das Hauptantigen des Virus dar (Bachrach et al., 1975).

Eine genaue Analyse der viralen RNA des MKSV ergab, daß diese, ebenso wie die viralen RNAs der anderen Picornaviren, am 5'-Ende mit einem kleinen viruskodierten Protein - VPg (genomisch gebundenes Virusprotein) - verknüpft ist (Sangar et al., 1977). Die RNAs des MKSV und der Cardioviren besitzen einen Poly-(C)-Trakt (Porter et al., 1974; Brown et al., 1974), der etwa 400 Nukleotide vom 5'-Ende entfernt beginnt und aus 100 bis 170 Cytosinresten in ununterbrochener Reihenfolge besteht (Harris et al., 1976; Black et al., 1979). Ungefähr 700 Nukleotide 3'-wärts vom Poly-(C)-Trakt startet ein ca. 7 kb langer durchgehender Leserahmen, der die kodierenden Sequenzen für die bekannten viralen Proteine

fusioniert enthält (Forss et al., 1984; Carroll et al., 1984). Bis zum Poly-(A)-Ende schließt sich eine nichtkodierende Sequenz von ca. 100 Nukleotiden an. Die Funktion der nichtkodierenden Bereiche am 5'- und 3'-Ende der viralen RNA ist noch nicht bekannt. Die ersten Nukleotide am 5'-Ende der RNA (Harris, 1980) als auch Nukleotidsequenzen vom 3'-Ende der RNA nahe dem Poly-(A)-Ende (Porter et al., 1978) erweisen sich als hoch konserviert. Es ist deshalb zu vermuten, daß sie bei der Replikation des Virus eine wichtige Rolle spielen.

2. RNA-Replikation und Proteinsynthese von MKSV

Die einheitliche Genomstruktur der Picornaviren sowie die hohe Homologie der Primärsequenz einiger Virusproteine, wie zum Beispiel die der RNA-abhängigen RNA-Polymerasen (70% zwischen Poliovirus und MKSV, Forss et al., 1984), implizieren einen gleichartigen Ablauf der RNA-Replikation und der Proteinsynthese. Untersuchungen zur Replikation sind bei Poliovirus am weitesten fortgeschritten, so daß diese Arbeiten richtungsweisend für MKSV und die anderen Picornaviren sind. Bezüglich der Proteinsynthese wurden die meisten Studien an Poliovirus, Encephalomyocarditisvirus (EMCV) und MKSV durchgeführt. Im Detail treten hier jedoch Unterschiede zwischen den einzelnen Genera auf, so daß Analogieschlüsse einer experimentellen Bestätigung bedürfen.

2.1 RNA-Replikation

Für die Replikation der viralen RNA werden virus-kodierte Proteine, wie die RNA-abhängige RNA-Polymerase und das VPg, benötigt, so daß die RNA-Synthese erst nach der Translation viraler Proteine einsetzen kann.

Die RNA-Replikation findet an der Zellmembran statt (Caliguiri et al., 1970). In mit Poliovirus infizierten Zellen wurden verschiedene, das VPg enthaltende, membran-assoziierte Vorläuferproteine (P3-9, X/9, 3b/9*) nachgewiesen, denen bei der Initiation der RNA-Synthese eine Funktion als Primer zugesprochen wird (Semler et al., 1982; Takegami et al., 1983a). Diese Vorläuferproteine werden zunächst über die Seitenkette des einzigen Tyrosins im VPg kovalent mit ein oder zwei Uridylsäureresten via Phosphodiesterbindung verknüpft (Takegami et al., 1983b; Crawford & Baltimore, 1983). Nach Basenpaarung dieser Uridylsäurereste mit Adenylsäureresten des 3'-Endes der viralen RNA und Assoziation mit der virus-kodierten RNA-abhängigen RNA-Polymerase und weiteren Faktoren kann die Synthese der (-)-Strang RNA ablaufen. Die Synthese von (+)-Strang RNA verläuft analog unter Verwendung der neu synthetisierten (-)-Strang RNA als Matrize.

Da alle naszierenden virusspezifischen RNA-Ketten am 5'-Ende kovalent mit dem VPg verknüpft sind, wird angenommen, daß schon während der RNA-Synthese die proteolytische Abspaltung des VPg von dem Vorläuferprotein stattfindet (Sangar et al., 1977b). Diese Spaltung wird bei Poliovirus von einer virus-kodierten Protease durchgeführt (Hanecak et al., 1982).

An Polysomen wurden nur virus-spezifische RNAs ohne VPg gefunden (Fernandez-Munoz & Lavi, 1977; King et al., 1980). Es konnte gezeigt werden, daß ein Enzym der Wirtszelle die

* P3-9, X/9 und 3b/9 entsprechen nach der systematischen Nomenklatur für Picornaviren (siehe Abb. 1; Rueckert & Wimmer, 1984) den Proteinen 3ab, 2c3ab und 2abc3ab.

Spaltung der Esterbindung zwischen VPg und dem 5'-Phosphat des endständigen Uridylsäurerestes der viralen RNA katalysiert (Sangar et al., 1981; Ambros & Baltimore, 1978). In Virushüllen werden nur VPg-gebundene virale (+)-Strang RNA-Moleküle verpackt. Man nimmt an, daß das VPg bei der Weichenstellung für die Verpackung bzw. Translation der RNA von Bedeutung ist (Wimmer, 1982).

2.2 Virus-spezifische Proteinsynthese

Nach Infektion der Zelle mit MKSV wird die wirtszell-spezifische Protein- sowie Nukleinsäuresynthese innerhalb von zwei Stunden nahezu vollständig abgeschaltet. Die Synthese virus-kodierter Proteine und viraler RNA kann dagegen ungehindert ablaufen (Black, 1975). Die ersten Virusproteine treten 90 Minuten nach Infektion in nachweisbaren Mengen auf. Ein Translationsprodukt, das der Gesamtlänge des viralen Leserahmens entspricht, ist jedoch nicht zu entdecken, da bereits während der Synthese die wachsende Peptidkette über primäre Spaltprodukte (P20a/P16, P88, P52 und P100; siehe Abb. 1A) zu den reifen Virusproteinen prozessiert wird. Neben Proteasen der Wirtszelle ist eine viruskodierte Protease an der proteolytischen Spaltung des viralen Polyproteins beteiligt (Sangar, 1979; Grubman & Baxt, 1982).

Doel et al. (1978) konnten durch Synchronisierung der Proteinsynthese und Pactamycin-Kartierung eine Zuordnung der Zwischenstufen und Endprodukte der limitierten Proteolyse des viralen Polyproteins erhalten und ihre translatorische Reihenfolge ermitteln. Vervollständigt wurde diese Genkarte durch die inzwischen veröffentlichten Arbeiten von Grubman et al. (1984a, siehe Abb. 1).

Die Vorläuferproteine werden in der translatorischen Reihenfolge P20a (bzw. P16), P88, P52 und P100 freigesetzt.

Die stabilen primären Spaltprodukte P20a und P16 sind dem NH₂-Ende des viralen Polyproteins zuzuordnen. Sie besitzen gemeinsame Peptidbereiche (Sangar et al., 1980). Beck et al. (1983) wiesen mit Hilfe von cDNA-Sequenzdaten nach, daß das unterschiedliche Molekulargewicht der NH₂-terminalen Proteine auf der Verwendung zweier verschiedener Startkodons bei der Translation des 7 kb langen Leserahmens beruht. Eine biologische Signifikanz für die Verwendung des einen oder anderen Startsignals ist noch nicht gefunden worden. Das Vorläuferprotein P88 besteht aus den vier Hüllproteinen VP1-4 (Sangar et al., 1976). Diese Anordnung ermöglicht es, daß die Hüllproteine nach ihrer Prozessierung miteinander komplexiert bleiben (Grubman et al., 1984b).

Über die Funktion der im Vorläuferprotein P52 enthaltenen Virusproteine ist sehr wenig bekannt. Bisher wurde nur gefunden, daß die Resistenz des Virus gegenüber Guanidin durch Mutationen im P34-Gen beeinflusst wird (Saunders & King, 1982).

Dem COOH-Ende des Vorläuferproteins P100 konnte die RNA-abhängige RNA-Polymerase zugeordnet werden (Sangar, 1979). Das VPg kodiert ebenfalls im Vorläuferprotein P100. Außergewöhnlich ist die Tandem-Anordnung drei VPg-kodierender Sequenzen bei MKSV, die nach Klonierung und Sequenzierung der cDNA identifiziert werden konnten (Forss & Schaller, 1982).

In Analogie zu Poliovirus und EMCV wird angenommen, daß das Vorläuferprotein P100 neben den VPgs und der RNA-abhängigen RNA-Polymerase die Virusprotease enthält.

2.3 Prozessierungsschema des viralen Polyproteins

Bei MKSV, Poliovirus und EMCV wurde die limitierte Proteolyse des viralen Polyproteins näher untersucht. Als Quelle für Virusproteine dienten entweder infizierte Zellkulturen oder in vitro-Translationssysteme. Es zeigte sich, daß die Prozessierung des Polyproteins in drei Etappen abläuft (Abb. 1):

i) Im *statu nascendi* wird die MKSV-spezifische Peptidkette an drei Stellen unter Freisetzung von P20a bzw. P16 und der primären Vorläuferproteine P88, P52 und P100 gespalten. Durch spezifische Hemmung der primären Spaltungen am Beispiel des poliovirus-spezifischen Polyproteins konnte Korant 1972 demonstrieren, daß Proteasen der Wirtszellen für die primären Spaltungen verantwortlich sind.

Burroughs et al. (1984) konnten zeigen, daß die Freisetzung des MKSV-spezifischen P20a bzw. P16 unabhängig von den anderen primären Spaltungen gehemmt werden kann und somit zumindest zwei Proteaseaktivitäten für die primären Prozessierungsschritte zuständig sind.

ii) Die weitere Prozessierung der MKSV-spezifischen Vorläuferproteine P88, P52 und P100 findet erst nach Beendigung der ersten Translationsrunde statt (Grubman & Baxt, 1982; Burroughs et al., 1984). Dies deutet auf die Beteiligung eines viruskodierten Proteins bei der weiteren Proteolyse der Vorläuferproteine hin.

Ergebnisse bezüglich der Identifizierung des proteolytisch aktiven Virusproteins und seines Genortes waren zu Beginn dieser Dissertation kontrovers. Aus mit Poliovirus infizierten Zellen wurde von Korant et al. (1979) ein mit einer Proteaseaktivität assoziiertes Virusprotein mit einem Molekulargewicht von 40000 gefunden, das von der mittleren

Region des Virusgenoms (2c, siehe Abb. 1B) kodiert wird. Ein anderes Ergebnis erzielten zwei Arbeitsgruppen (Palmenberg et al., 1979; Gorbalenya et al., 1979), welche bei EMCV ein ca. 20 kDa großes Virusprotein mit Proteaseaktivität anreicherten, das dem COOH-terminalen Bereich des viralen Polyproteins (3c, siehe Abb. 1B) zugeordnet wurde. Ein weiterer Vorschlag für eine virus-kodierte Protease stammt von Lawrence & Thach (1975), welche nach der Isolierung des Kapsidproteins (entspricht dem MKSV-Protein VP2, siehe dazu Abb. 1A) aus mit EMCV infizierten Zellen eine Proteaseaktivität in dieser Fraktion nachweisen konnten. Bei MKSV konnte die Proteaseaktivität weder einem der bekannten Virusproteine zugeordnet werden noch war der Genort zu Beginn dieser Arbeit bekannt.

iii) Die Prozessierung des VP0 zu den Hüllproteinen VP4 und VP2 tritt erst nach dem Zusammenbau der Virushülle, des sogenannten Prokapsids, während der Verpackung der viralen RNA auf (Jacobson & Baltimore, 1968; Black, 1975). Über die zugehörige Proteaseaktivität ist nichts bekannt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß an der Prozessierung des MKSV-spezifischen Polyproteins zumindest drei verschiedene Proteaseaktivitäten beteiligt sind. Die viruskodierte Protease katalysiert dabei die sekundären Spaltungen der Vorläuferproteine.

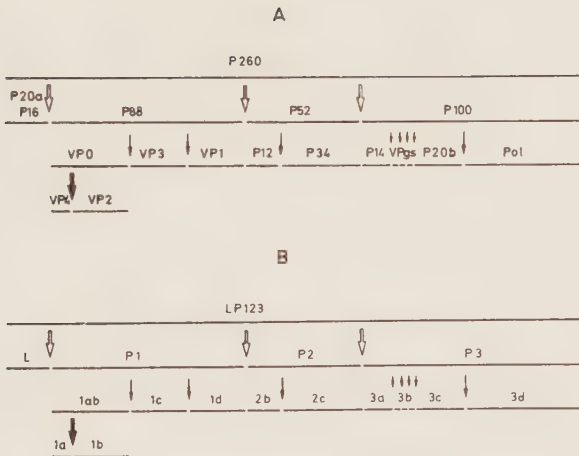


Abb. 1

Prozessierungsschema des MKSV-spezifischen Polyproteins

Die drei Schritte bei der Prozessierung des viralen Polyproteins sind dargestellt. Pfeile kennzeichnen jeweils die erfolgten Spaltungen (offener Pfeil: primäre Spaltung; kleiner Pfeil: sekundäre Spaltung; großer schwarzer Pfeil: Reifespaltung). Die Proteine sind A) nach der von Newman et al. (1979) gewählten Bezeichnung bzw. B) mit der nach Rueckert & Wimmer (1984) vorgeschlagenen systematischen Nomenklatur für die Proteine von Picornaviren dargestellt.

3. Untersuchung der limitierten Proteolyse des viralen Polyproteins in Abhängigkeit von der MKSV-spezifischen Protease

Bisher wurde die Prozessierung des viralen Polyproteins entweder an infizierten Zellkulturen - bei gleichzeitig ablaufender Virusreplikation - oder nach in vitro-Translation der viralen RNA in HeLa-, Retikulozyten- oder Ehrlich Aszitis-Zellextrakten studiert.

Durch die gleichzeitige Präsenz aller beteiligten Proteasen sind die oben beschriebenen Systeme sehr komplex und erschweren die zweifelsfreie Zuordnung von Spaltstellen und Proteaseaktivitäten. Hinderlich sind auch die strengen Sicherheitsvorkehrungen (Arbeiten unter L4-artigen Bedingungen*) die beim Arbeiten mit infektiösem MKSV erforderlich sind. Außerdem ermöglichen die genannten Untersuchungssysteme nur eine kurzzeitige und schwache Expression viraler Proteine, so daß diese nur durch Isotopenmarkierung nachgewiesen werden können.

Daher wurde nach einem zusätzlichen Prozessierungssystem gesucht, welches die Untersuchung der viralen Protease und ihrer spezifischen Aktivität erleichtert. Die folgenden Kriterien sollten erfüllt werden:

- i) Die virale Protease soll von den Aktivitäten der anderen an der Prozessierung beteiligten Proteasen abgetrennt werden,
- ii) die Protease und ihr natürliches Substrat sollen in hinreichenden Mengen produziert werden und
- iii) Virusreplikation soll ausgeschlossen sein, um eine Rückstufung der Sicherheitsvorkehrungen für die geplanten Experimente zu ermöglichen.

* Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in vitro neukombinierte Nukleinsäuren (Bundesministerium für Forschung und Technologie).

Nach Klonierung des MKSV-Genoms durch Küpper et al. (1981) standen cDNA-Klone zur Verfügung, die mich in die Lage versetzten, einen neuartigen Weg für die Entwicklung eines Prozessierungsmodells einzuschlagen. Das Ziel meiner Arbeit war es, Teilbereiche des viralen Genoms nach in vitro-Rekombination der klonierten virus-spezifischen cDNA in E. coli so zu exprimieren, daß Proteine synthetisiert werden können, welche dem viralen Polyprotein bzw. einem der primären Spaltprodukte vergleichbare Eigenschaften besitzen. Bei gleichzeitiger Expression der viralen Protease sollte eine Prozessierung zu den reifen Virusproteinen stattfinden.

Der Punkt i) der oben gestellten Anforderungen an das Prozessierungssystem wäre durch den Wechsel des Zellsystems erfüllt. Da für die Expression in E. coli effiziente Expressionssysteme zur Verfügung stehen, können hohe Proteinausbeuten erreicht werden, wie im Punkt ii) gefordert wird. Werden nur Teilbereiche des Virusgenoms exprimiert, so wäre eine Virusreplikation ausgeschlossen und der Punkt iii) erfüllt.

4. Regulierbare Expression MKSV-spezifischer Proteinsequenzen in E. coli

Die zur Verfügung stehenden E. coli Klone enthielten MKSV(Stamm O₁K*)-spezifische cDNA-Fragmente bis zu einer Größe von 2,5 kb (Küpper et al., 1981). Sie überdecken 5 kb der viralen RNA vom 3'-Ende her (siehe Abbildung 2).

Um MKSV-spezifische Gene in E. coli zu exprimieren, müssen diese mit prokaryotischen Transkriptions- sowie Translationssignalen versehen werden. Im Expressionsplasmid pPLc24 ist der starke linke Promoter p_L des Bakteriophagen λ mit dem 5'-Ende des Polymerasegens des Bakteriophagen MS2, einschließlich der Ribosomenbindungsstelle, fusioniert. Mit Hilfe dieser Konstruktion wird eine effiziente Expression ermöglicht (Remaut et al., 1981). Sie läßt sich mittels eines temperatursensitiven Repressors cI857 (Lieb, 1966) regulieren. Der Repressor cI857 blockiert die p_L-abhängige Transkription bei 28°C. Nach Temperaturerhöhung auf 42°C wird die Blockierung aufgehoben und die p_L-abhängige Transkription kann anlaufen.

Von Küpper et al. (1981) wurde ein cDNA-Fragment, welches für das Hüllprotein VP1 des MKSV kodiert, so in das Plasmid pPLc24 eingefügt, daß der virale Leserahmen sich in Phase an den der MS2-Polymerase anschließt (Abb. 3). Von dem neu konstruierten Plasmid pPLVP1 wird ein 45 kDa-Fusionsprotein exprimiert, bei welchem sich an die NH₂-terminale Aminosäuresequenz der MS2-Polymerase (99 Aminosäuren) der MKSV-spezifische Teil des Proteins anschließt. Mit Anti-O₁K-Serum kann gezeigt werden, daß das exprimierte Protein antigene Determinanten des Hüllproteins VP1 besitzt. Dieses Fusionsprotein wird in Bakterien zu einem Anteil von etwa 5% am Gesamtprotein der Zellen produziert.

* Der Virusstamm O₁K wurde 1966 bei einem MKS-Ausbruch in Kaufbeuren isoliert.

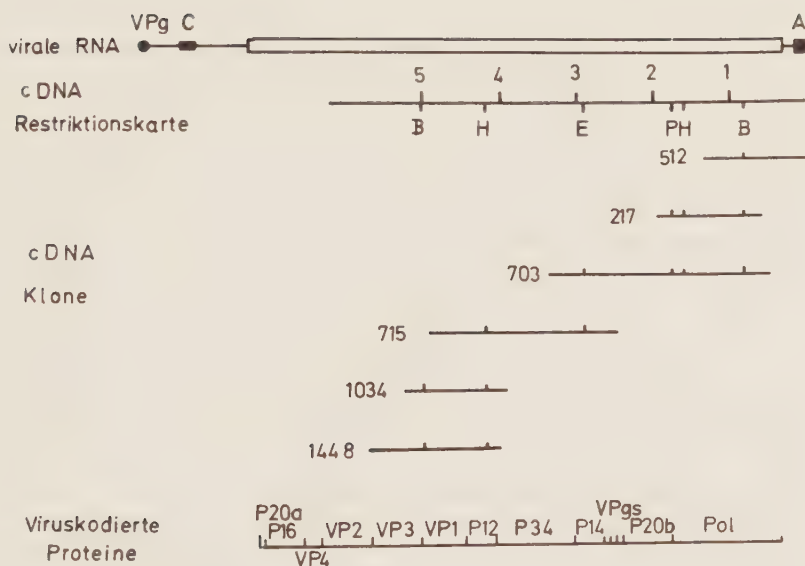


Abb. 2

Korrelation der klonierten cDNA-Fragmente mit der cDNA-Restriktionskarte, der viralen RNA und der Genkarte des MKSV

Die virale RNA ist mit ihren charakteristischen Strukturelementen dargestellt. VPg ist das kovalent an das 5'-Ende gebundene Virusprotein, C und A bezeichnen den Poly(C)-Trakt bzw. das Poly(A)-Ende. Der offene Balken stellt den Leserahmen dar. Auf der cDNA-Restriktionskarte sind die Restriktionsschnittstellen angegeben, welche eine Zuordnung der cDNA-Fragmente zur cDNA-Restriktionskarte ermöglichten (B=BamHI, H=HindIII, E=EcoRI, P=PstI). Die cDNA ist in Abschnitte von 1 kbp aufgeteilt. Die cDNA-Inserts sind mit den Bezeichnungen der isolierten cDNA-Klone versehen. Zur Korrelation der cDNA-Fragmente ist die Genkarte des MKSV eingezeichnet.

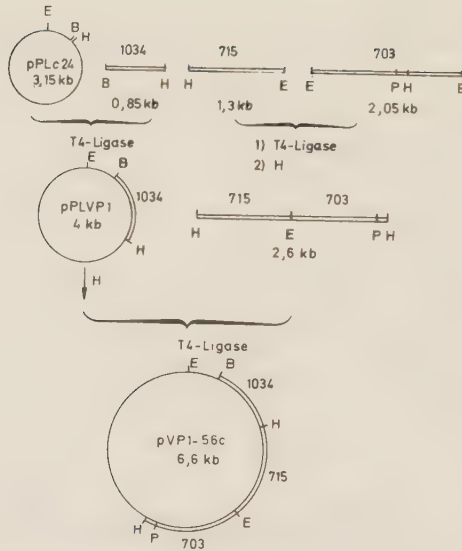


Abb. 3

Konstruktion von pLVP1 und pVP1-56c

pLVP1: Aus dem cDNA-Klon 1034 wurde das B-H-Fragment isoliert und in den mit B und H linearisierten Vektor pPLc24 eingebaut.

pVP1-56c: Das MKSV-spezifische H-E-Fragment von Klon 715 und das MKSV-spezifische E-B-Fragment von Klon 703 wurden miteinander ligiert, anschließend mit H nachgespalten und in das mit H linearisierte Plasmid pLVP1 eingebaut. Der Einbau des richtigen Fragmentes in der gewünschten Orientierung wurde durch in situ-Hybridisierung und Restriktionsverdau sichergestellt. Die MKSV-spezifischen Sequenzen sind als offene Balken eingezeichnet. Um die Zuordnung der cDNA-Fragmente zu erleichtern, sind die Bezeichnungen der cDNA-Klone mit angegeben. Die für die Konstruktionen relevanten Restriktionschnittstellen sind angegeben (H=HindIII; E=EcoRI; B=BamHI; P=PstI).

Das hier vorgestellte Expressionssystem sollte nun verwendet werden, um die virus-spezifische Prozessierung in Abhängigkeit von der viralen Protease zu untersuchen. Dazu sollte der MKSV-spezifische Anteil des Expressionsplasmids pPLVP1 über den Leserahmen für die virale Protease hinaus verlängert werden.

In der Diplomarbeit gelang es mir, drei cDNA-Fragmente in genomischer Reihenfolge zu verknüpfen und in das Expressionsplasmid einzubauen (Abb. 3). Die insertierte MKSV-spezifische Sequenz umfaßte 3,5 kbp. Bei korrekter Rekonstitution des viralen Leserahmens sollte von dem neu konstruierten Plasmid pVP1-56c ein MKSV-spezifisches Polypeptid mit einem Molekulargewicht von etwa 145000 exprimiert werden.

Wie aus Abb. 4 zu ersehen ist, haben die von pPLVP1 und pVP1-56c kodierten MKSV-spezifischen Proteine identische NH₂-Enden. An die NH₂-terminale Sequenz der MS2-Polymerase schließt sich der MKSV-spezifische Teil des Proteins an. Er umfaßt in beiden Proteinen 205 Aminosäuren des Hüllproteins VP1 (die ersten acht Aminosäuren von VP1 fehlen dabei konstruktionsbedingt) und weitere 78 MKSV-spezifische Aminosäuren, die zu dem darauffolgenden Virusprotein P12 gehören. Im Falle des von pVP1-56c kodierten Proteins schließt sich noch eine MKSV-spezifische, 867 Einheiten umfassende Aminosäuresequenz an, welche die Domänen aller Nichtstrukturproteine - bis auf die RNA-abhängige RNA-Polymerase - enthält. Bei beiden Proteinen folgen auf die MKSV-spezifischen Sequenzen vektorkodierte Aminosäuren, welche das COOH-Ende der Proteinketten bilden.

Das auf pVP1-56c kodierte MKSV-spezifische Polyprotein sollte die Proteindomäne der viralen Protease enthalten. Unter der Annahme, daß die virale Protease als Bestandteil des in E. coli exprimierten MKSV-spezifischen Polyproteins proteolytisch aktiv ist, wäre ein limitierter Abbau dieses Polyproteins zu erwarten.

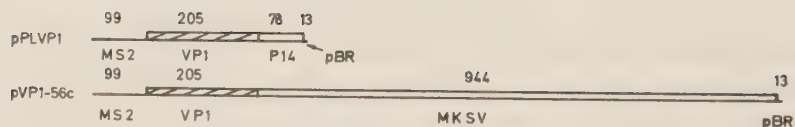


Abb. 4

Aufbau der auf pPLVP1 und pVP1-56c kodierten Fusionsproteine. Die einzelnen Domänen der von pPLVP1 und pVP1-56c kodierten Fusionsproteine sind schematisch von links nach rechts in Translationsrichtung dargestellt. Vektorkodierte Sequenzen sind mit einem dünnen Strich gekennzeichnet, wobei MS2 für die NH_2 -terminalen Sequenzen der MS2-Polymerase und pBR für die pBR322-kodierten Sequenzen am COOH-Ende der Fusionsproteine steht. MKSV-spezifische Sequenzen sind als offene Balken dargestellt. Der schraffierte Teil entspricht der VP1-spezifischen Sequenz. Die Zahlen geben die Anzahl der jeweils zu den einzelnen Abschnitten gehörenden Aminosäuren an.

Der spezifische Nachweis des von pVP1-56c exprimierten MKSV-spezifischen Polyproteins stellte den Einstieg für diese Dissertation dar. Anhand des Molekulargewichts des MKSV-spezifischen Polypeptids sollte überprüft werden, ob erstens der virale Leserahmen richtig rekonstruiert worden ist und zweitens das davon exprimierte Polyprotein prozessiert wird. Bei tatsächlich stattfindender Prozessierung des MKSV-spezifischen Polyproteins in E. coli sollen sodann folgende Fragen beantwortet werden:

i) Welchem Genort kann die MKSV-spezifische Protease zugeordnet werden? Mit Hilfe von Deletionsmutanten soll der für die Expression einer aktiven Protease essentielle Genomabschnitt eingegrenzt werden. Ein Vergleich mit der Genkarte des MKSV ermöglicht dann die eindeutige Zuordnung der Proteaseaktivität.

ii) Wo schneidet die virale Protease das in E. coli exprimierte Polyprotein? Unter Berücksichtigung von Molekulargewicht und antigenen Eigenschaften können die Spaltprodukte bestimmten Teilen des Polyproteins zugeordnet werden. Dadurch ließe sich ein indirekter Hinweis auf die von der Virusprotease erkannten Spaltstellen finden.

iii) Stellt das entwickelte Prozessierungssystem ein brauchbares Modell zur Untersuchung der limitierten Proteolyse des viralen Polyproteins dar? Ein Vergleich der in E. coli erfolgten Spaltungen mit in vivo bzw. in vitro erzielten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen soll darüber Aufschluß geben.

C ERGEBNISSE

1. IDENTIFIZIERUNG DES MKSV-SPEZIFISCHEN EXPRESSIONSPRODUKTES VON pVP1-56c

Das Plasmid pVP1-56c sollte für ein MKSV-spezifisches Polyprotein mit autoproteolytischer Aktivität kodieren (vergleiche Einleitung, Seite 21 unten). Spaltprodukte dieses Polyproteins sollten anhand der Molekulargewichte und ihrer spezifischen Antigen determinanten identifiziert werden.

Zunächst sollte in einer Kinetik ermittelt werden, zu welchem Zeitpunkt nach Induktion der Expression maximale Mengen des MKSV-spezifischen Polypeptids in E. coli akkumulieren. Bakterienlysate mit hohem Antigengehalt sollten sodann zur Molekulargewichtsbestimmung des bzw. der MKSV-spezifischen Polypeptide verwendet werden.

1.1 Nachweis von Peptiden mit VP1-spezifischen Antigen-Determinanten in Bakterienextrakten mittels ELISA

Für einen empfindlichen und spezifischen Nachweis in E. coli exprimierter MKSV-spezifischer Polyproteine wurden immunologische Methoden herangezogen.

Dazu wurden von Herrn Dr. K. Strohmeier aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (Tübingen) polyspezifische Antikörper gegen den Serotyp (O₁K) von MKSV zur Verfügung gestellt. Diese Antikörper wurden durch Immunisierung von Ziegen mit O₁K-Virus, welches vor der Impfung mit Formaldehyd inaktiviert worden war, gewonnen. Ein großer Anteil der induzierten Antikörper ist gegen das Hauptantigen des Virus, das Hüllprotein VP1, gerichtet. Mit Hilfe dieser Antikörper wurde ein ELISA entwickelt, der den Nachweis virus-spezifischer Polypeptide mit VP1-Antigen-

determinanten des gleichen Serotyps O₁K in Bakterienextrakten erlaubt. Da diese VPl-spezifischen Peptidsequenzen Bestandteil der von pPLVPl bzw. pVPl-56c exprimierten MKSV-spezifischen Polypeptide sind (vergleiche Abb. 4), sollten diese VPl-spezifischen Expressionsprodukte im ELISA nachzuweisen sein.

Im ELISA (ezyme linked immunosorbent assay) werden spezifische Antigen-Determinanten - nach Adsorption des nachzuweisenden Proteins an festes Trägermaterial - durch Antikörperbindung aufgespürt. Spezifisch gebundene Antikörpermoleküle werden von einem zweiten Antikörper erkannt, der gegen den ersten gerichtet ist. Gebundene Antikörper werden durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht, welche von einem an den zweiten Antikörper gekoppelten Enzym - in diesem Fall der Peroxidase - katalysiert wird.

Für eine kinetische Untersuchung wurden während der Expression von pVPl-56c bzw. pPLVPl (als Kontrolle) zu verschiedenen Zeitpunkten Proben abgenommen und die daraus gewonnenen Bakterienextrakte im ELISA mit Anti-O₁K-Serum auf Anwesenheit VPl-spezifischer Antigene untersucht. Um eine vergleichende quantitative Bestimmung zu erlauben, wurden alle Bakterienextrakte auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt.

Bei Expression von pPLVPl nehmen die VPl-spezifischen Antigendeterminanten stetig zu und erreichen nach einer Stunde ein Plateau. Die Menge an spezifisch erkanntem Protein bleibt sodann über den beobachteten Zeitraum konstant (Abb. 5), d. h. das VPl-spezifische Protein wird im Vergleich zu den E. coli-Proteinen zu einem konstanten Anteil synthetisiert. Dagegen steigen die von pVPl-56c exprimierten VPl-Antigendeterminanten nur bis 20 Minuten nach Induktion der Expression an und sinken innerhalb von 3 Stunden bis unter die Nachweisgrenze ab.

Die dieser Abnahme zugrunde liegenden Ursachen werden in Kapitel 3 behandelt.

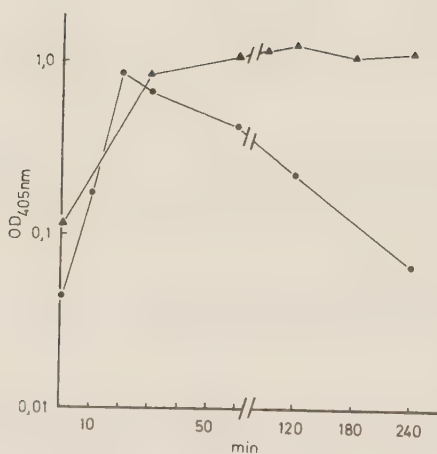


Abb. 5

Verlauf der Expressionsrate MKSV-spezifischer Proteine von pPLVP1 und pVP1-56c

Während der Expression von pPLVP1 und pVP1-56c wurden Proben abgenommen, die Zellen lysiert und in den Bakterienextrakten die Menge VP1-spezifischer Antigen-Determinanten mit Anti-O₁K-Serum im ELISA bestimmt. (▲) pPLVP1; (●) pVP1-56c.

Somit ist gezeigt, daß von pVP1-56c ein VP1-spezifisches Polyprotein exprimiert wird. Aufgrund der Abnahme der VP1-spezifischen Antigene mit zunehmender Expressionsdauer wurden zur weiteren Charakterisierung des MKSV-spezifischen Polyproteins die Expressionen spätestens 60 Minuten nach Induktion abgebrochen.

1.2 Molekulargewichtsbestimmung des VP1-spezifischen Expressionsproduktes von pVP1-56c

Die Größe des von pVP1-56c exprimierten MKSV-spezifischen Polyproteins sollte Aufschluß darüber geben, ob der virale Leserahmen richtig rekonstituiert worden ist. Falls die virale Protease Bestandteil dieses Polyproteins ist, kann damit gerechnet werden, daß eine Prozessierung dieses Polyproteins stattfindet. Neben dem primären Translationsprodukt können dann Spaltprodukte auftreten.

Für die Molekulargewichtsbestimmung wurden Kulturproben 60 Minuten nach Induktion der Expression entnommen und die Proteine nach Lyse der Zellen im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Im Vergleich zu pPLc24 (Abb. 6A, Spur 3) ist bei pVP1-56c (Abb. 6A, Spur 2) eine zusätzliche Bande bei 34 kDa zu beobachten. Ein Expressionsprodukt mit einem der Länge des rekombinierten MKSV-spezifischen Leserahmens entsprechenden Molekulargewicht von 145000 ist hingegen nicht zu entdecken.

Mittels Immunoblot sollte geklärt werden, ob die im ELISA nachgewiesenen VP1-Antigendeterminanten auf dem 34 kDa-Protein lokalisiert sind. Dazu wurden in einem parallelen Ansatz im SDS-Polyacrylamidgel Bakterienlysate nach Expression von pPLVP1, pPLc24 und pVP1-56c aufgetrennt, die Proteine anschließend elektrophoretisch auf Nitrozellulosefilter übertragen und dort mit Anti-O₁K-Serum auf

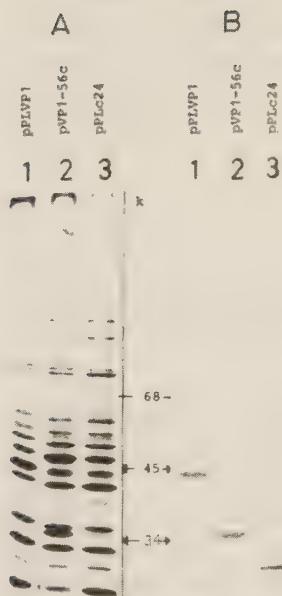


Abb. 6

Nachweis p_L -abhängig exprimierter MKSV-spezifischer Proteine von pPLVP1 und pVP1-56c im SDS-Polyacrylamidgel bzw. im Immunoblot

Bakterienzellen wurden 60 Minuten nach Expression von pPLc24, pPLVP1 bzw. pVP1-56c lysiert. Die Lysate wurden parallel in 2 Ansätzen im SDS-Polyacrylamidgel (13%) aufgetrennt.

A) Die eine Hälfte des Gels wurde mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

B) Die in der anderen Hälfte des Gels aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch auf Nitrozellulosefilter transferiert und dort mit Anti- O_1K -Serum behandelt.

Die Molekulargewichte der Markerproteine sind in der Mitte angegeben. Mit Pfeilen und den dazugehörigen Molekulargewichten sind die von pPLVP1 bzw. pVP1-56c exprimierten MKSV-spezifischen Proteine gekennzeichnet.

Anwesenheit VP1-spezifischer Antigendeterminanten geprüft. Wie im ELISA wird die spezifische Bindung der Antikörper an Protein indirekt mittels einer Indikatorreaktion - katalysiert durch die antikörpergebundene Peroxidase - nachgewiesen.

Im Immunoblot wird von pPLVP1 ein 45 kDa-Protein (positive Kontrolle, Abb. 6B, Spur 1) und von pVP1-56c ein 34 kDa-Protein angefärbt (Abb. 6B, Spur 2). Das 34 kDa-Protein besitzt somit VP1-spezifische Antigendeterminanten. Die Lage der VP1-spezifischen Peptidbereiche (siehe Abb. 4) erlaubt den Schluß, daß das 34 kDa-Protein dem NH₂-Ende des in E. coli exprimierten Polyproteins entspricht.

Die distinkt auftretende VP1-spezifische Bande nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des Bakterienlysates zeigt auch, daß die Abnahme der VP1-spezifischen Antigene während der Expression von pVP1-56c (siehe Abb. 5) nicht auf einem unspezifischen Abbau durch E. coli-Peptidasen beruhen kann. Es wäre sonst eine heterogene Verteilung von VP1-spezifischen Degradationsprodukten zu erwarten gewesen.

Falls das 145 kDa-Polyprotein tatsächlich von pVP1-56c exprimiert wird, würde das VP1-spezifische 34 kDa-Protein ein Spaltprodukt darstellen, welches durch eine quantitativ erfolgte Prozessierung des Polyproteins freigesetzt wurde.

Wenn das 34 kDa-Protein durch proteolytische Spaltung eines Vorläuferproteins entsteht, stellt sich die Frage, warum das 45 kDa-Protein von pPLVP1, welches ebenfalls die zur Freisetzung des 34 kDa-Proteins benutzte potentielle Spaltstelle enthalten sollte, nicht zum 34 kDa-Protein prozessiert wird. Entweder ist im 45 kDa-Protein die Spaltstelle nicht zugänglich oder die proteolytische Aktivität ist nicht vorhanden. Die letzte Folgerung schließt die Beteiligung zellulärer Proteasen an der Prozessierung aus, so daß die Proteaseaktivität plasmidkodiert, d. h. ein Bestandteil des von pVP1-56c exprimierten Polyproteins ist. Dies würde bedeuten, daß die virale Protease in E. coli exprimiert wird und proteolytisch aktiv ist.

2. NACHWEIS MKSV-SPEZIFISCHER PROTEASEAKTIVITÄT IN E. COLI UND BESTIMMUNG DES GENORTES DER VIRALEN PROTEASE

Nimmt man an, daß der virale Leserahmen auf pVP1-56c intakt ist und das MKSV-spezifische Translationsprodukt proteolytisch aktiv ist, so kann ein stabiles primäres Expressionsprodukt nur erhalten werden, wenn der die Prozessierung katalysierende Proteinbereich fehlt. Nach Deletion der entsprechenden, für die Protease kodierenden DNA-Sequenzen sollte somit das von den Deletionsmutanten exprimierte Polyprotein keiner proteolytischen Spaltung mehr unterliegen.

Teilsequenzen des MKSV-spezifischen Leserahmens von Plasmid pVP1-56c wurden daher so subkloniert, daß die neu entstandenen Plasmide im Vergleich zu pVP1-56c vom 3'-Ende verkürzte virale Leserahmen enthielten. Bei Verlust der Proteaseaktivität müßten die MKSV-spezifischen Translationsprodukte der Länge der Leserahmen entsprechen.

Mit Hilfe dieser Deletionsmutanten könnte demnach die Kontinuität des rekombinierten Leserahmens demonstriert und somit indirekt der Nachweis für ein primäres Translationsprodukt mit proteolytischer Aktivität erbracht werden. Zugleich wird der für die virale Protease kodierende Bereich auf dem Virusgenom eingeeengt.

2.1 Konstruktion der Plasmide pVP1-52 und pVP1-56c^Δ

pVP1-52:

Das EcoRI-Fragment von Plasmid pVP1-56c, welches das MS2-Fragment, das BamHI-HindIII-Fragment von Klon 1034 und das HindIII-EcoRI-Fragment von Klon 715 enthält, wurde isoliert und in das mit EcoRI linearisierte Plasmid pLc24 eingebaut (siehe Abb. 7A). Bei Einbau in der gewünschten Orientierung wird das MS2-Fragment benachbart zu dem p_L-Fragment des Expressionsplasmides eingebaut und bildet eine funktionsfähige Expressionseinheit.

Die komplette p_L-abhängige Expressionseinheit in Plasmid pVP1-52 kodiert für ein Polyprotein, welches in Translationsrichtung aus NH₂-terminalen Sequenzen der MS2-Polymerase, dem VP1-Hüllprotein und dem größten Teil des Vorläuferproteins P52 aufgebaut ist. Im Vergleich zu pVP1-56c fehlt dem neu konstruierten Plasmid ein 1,3 kb DNA-Fragment, welches für das Virusvorläuferprotein P56c kodiert (siehe Abb. 7B).

pVP1-56c^Δ

Aus Plasmid pVP1-56c wurde ein PstI-Fragment isoliert (Abb. 7A), welches eine komplette Expressionseinheit enthält, bestehend aus dem p_L-Fragment, dem MS2-Fragment, dem BamHI-HindIII-Fragment von Klon 1034, dem HindIII-EcoRI-Fragment von Klon 715 und dem EcoRI-PstI-Fragment von Klon 703. Der virale, auf dem Plasmid pVP1-56c vorhandene Leserahmen wurde durch den PstI-Schnitt um 152 Nukleotide verkürzt. Das PstI-Fragment wurde in den Vektor pBRc24, welcher aus pLc24 durch Austausch des p_L-Fragments gegen das PstI-EcoRI-Fragment von pBR327 hervorgeht, eingebaut. Das noch in pBRc24 enthaltene MS2-Fragment ist ohne vorgeschaltete Promotersequenz funktionslos.

Die komplette p_L-abhängige Expressionseinheit von pVP1-56c^Δ kodiert für ein Polyprotein, welchem im Vergleich zu dem auf pVP1-56c kodierten 51 MKSV-spezifische Aminosäuren am COOH-Ende fehlen (Abb. 7B).

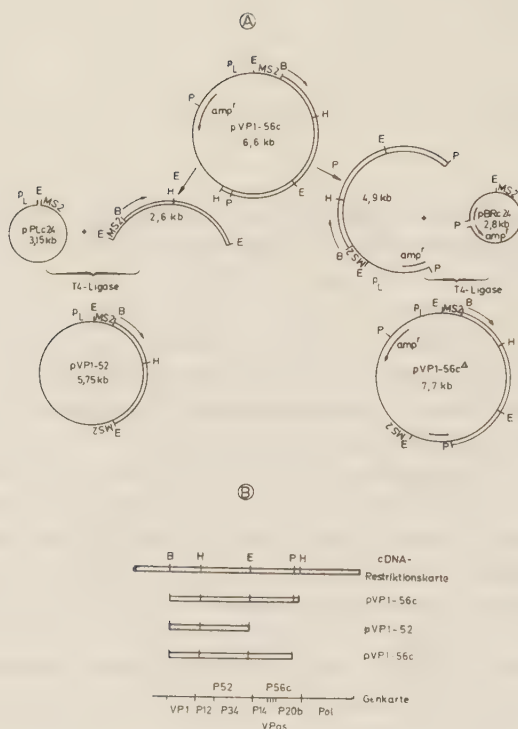


Abb. 7

Konstruktion der Plasmide pVP1-52 und pVP1-56c Δ

Ausgehend von pVP1-56c wurden die Plasmide pVP1-52 und pVP1-56c Δ konstruiert. In A) sind die Konstruktionswege von pVP1-52 bzw. pVP1-56c Δ schematisch dargestellt.

Konstruktion von pVP1-52: Das 2,6 kb EcoRI-Fragment von pVP1-56c wurde in den mit EcoRI linearisierten Vektor pPLc24 inseriert. Einbau in der gewünschten Orientierung wurde durch Restriktionsverdau überprüft.

Konstruktion von pVP1-56c Δ : Das 4,9 kb PstI-Fragment von pVP1-56c wurde in den mit PstI linearisierten Vektor pBRC24 inseriert.

Die für die Konstruktionen relevanten Restriktionsschnittstellen sind angegeben (E=EcoRI; B=BamHI; H=HindIII; P=PstI). Amp^r bezeichnet das die Ampicillin-Resistenz vermittelnde Gen. Mit Pfeilen ist die Orientierung der MKSV-spezifischen Leserahmen angegeben.

B) zeigt die MKSV-spezifischen cDNA-Sequenzen der Plasmide pVP1-52, pVP1-56c Δ und pVP1-56c in Korrelation zu der cDNA-Restriktionskarte und zur Genkarte des MKSV. Neben den Virusproteinen sind auch Vorläuferproteine angegeben.

2.2 MKSV-spezifische Expressionsprodukte von pVP1-52 und pVP1-56c^Δ

60 Minuten nach Induktion der Expression von pVP1-52 bzw. pVP1-56c^Δ wurden die Zellen lysiert und die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im mit Coomassie Brilliant Blue gefärbten Gel wurden im Vergleich zur Kontrolle (Bakterienlysate nach Expression von pVP1-56c; Abb. 8A,B,C und D, Spur 2) zusätzlich bei pVP1-52 ein 95 kDa- (Abb. 8A, Spur 1) und bei pVP1-56c^Δ ein 140 kDa-Protein (Abb. 8C, Spur 3) entdeckt. Im Immunoblot wurden nach Behandlung mit Anti-O₁K-Serum ebenfalls das 95 kDa-Protein von pVP1-52 (Abb. 8B, Spur 1) und das 140 kDa-Protein von pVP1-56c^Δ (Abb. 8D, Spur 3) spezifisch angefärbt. Die Molekulargewichte dieser von pVP1-52 und pVP1-56c^Δ exprimierten MKSV-spezifischen Proteine stimmen mit den aus der Länge der Leserahmen kalkulierten überein.

Mit Hilfe der zwei neuen Plasmidkonstruktionen kann also gezeigt werden, daß die aus dem Plasmid pVP1-56c subklonierten DNA-Fragmente einen intakten Leserahmen enthalten. Da durch diese Subklonierung MKSV-spezifischer DNA-Sequenzen im Expressionsplasmid die limitierte Proteolyse des MKSV-spezifischen Polyproteins aufgehoben werden kann, ist bewiesen, daß die ausschließlich bei Expression von pVP1-56c nachgewiesene Proteaseaktivität plasmidkodiert und somit virus-spezifisch ist.

Die erzielten Ergebnisse lassen nunmehr folgenden Schluß zu: Die virale Protease wird in E. coli als Bestandteil des MKSV-spezifischen Polyproteins exprimiert und katalysiert dessen Prozessierung, wobei ein VP1-spezifisches Spaltprodukt definierter Größe freigesetzt wird.

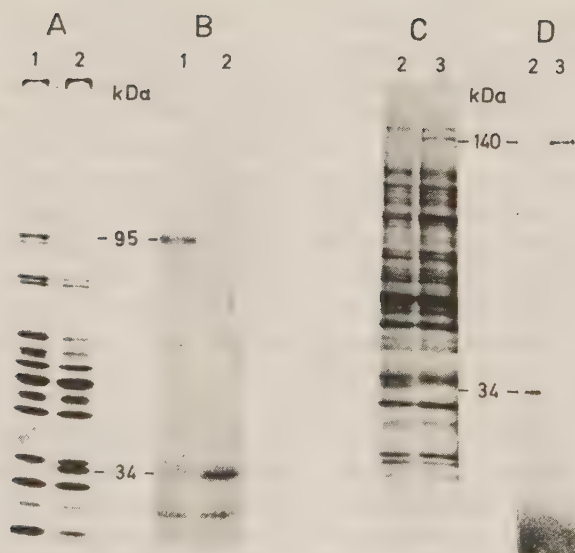


Abb. 8

Identifizierung der MKSV-spezifischen Fusionsproteine nach Expression von pVP1-52 bzw. pVP1-56c Δ

45 Minuten nach Induktion der Expression von pVP1-52 bzw. pVP1-56c Δ wurden die Zellen lysiert. Die Lysate wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Kontrolle wurden Bakterienlysate nach Expression von pVP1-56c eingesetzt.

A) und C) Gele nach Coomassie Brilliant Blue-Färbung

B) und D) Immunoblot nach Behandlung mit Anti-O₁K-Serum

(1) pVP1-52; (2) pVP1-56c (3) pVP1-56c Δ .

Die VP1-spezifischen Expressionsprodukte von pVP1-52 bzw. pVP1-56c Δ sind bei 95 kDa bzw. 140 kDa zu sehen.

2.3 Genort der MKSV-spezifischen Protease

Auf Grund der mit den Plasmiden pVP1-52 und pVP1-56c^Δ erzielten Ergebnisse läßt sich nunmehr das Proteasegen auf der genetischen Karte des Virus lokalisieren. Dem Plasmid pVP1-56c^Δ fehlen, im Vergleich zu pVP1-56c, 152 bp MKSV-spezifischer DNA-Sequenz. Da die Deletion dieser 152 bp zum Verlust der virus-spezifischen Proteaseaktivität führte, sind diese 152 bp essentiell für die Aktivität der Protease, d. h. sie kodieren für einen Proteinanteil der viralen Protease. Das 152 bp cDNA-Fragment läßt sich auf der Genkarte des MKSV eindeutig der für das Virusprotein P20b kodierenden Sequenz zuordnen (Abb. 7B). Die P20b-Domäne des von pVP1-56c exprimierten Polyproteins entspricht somit der viralen Protease.

2.4 Suche nach weiteren Spaltprodukten

Bei einer virus-spezifischen Prozessierung des von pVP1-56c exprimierten Polyproteins ist auf Grund des bekannten Prozessierungsschemas (Abb. 1) zu erwarten, daß neben dem VP1-spezifischen 34 kDa-Protein weitere Spaltprodukte mit unterschiedlichen Molekulargewichten (4000 bis 34000) entstehen, die in Abb. 9 dargestellt sind. Diese Spaltprodukte sollten den reifen Virusproteinen P12, P34, P14, den drei VPgs und der Protease (P20b) entsprechen bzw., das COOH-Ende des Polyproteins betreffend, ein Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 4000 aus viruskodierten und vektorkodierten Aminosäuren ergeben.

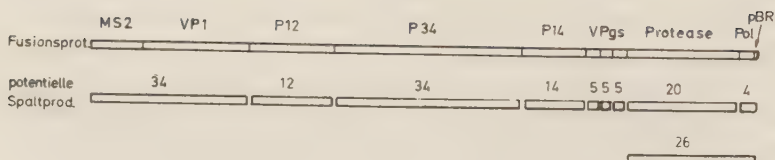


Abb. 9

Spektrum der bei vollständiger Prozessierung des 145 kDa-Fusionsproteins von pVP1-56c zu erwartenden Spaltprodukte.

Der obere Balken stellt die Aminosäurekette des von pVP1-56c kodierten 145 kDa-Proteins dar. Die Domänen der einzelnen Virusproteine sind durch senkrechte Striche voneinander abgegrenzt, ihre Bezeichnung ist oberhalb des Balkens angegeben. Mit MS2 sind die 99 NH_2 -terminalen Aminosäuren der MS2-Polymerase bezeichnet. Die Domäne des VP1 ist unvollständig; es fehlen die acht NH_2 -terminalen Aminosäuren. An die Protease schließen sich noch die ersten 21 NH_2 -terminalen Aminosäuren der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Pol) und 13 plasmidkodierte Aminosäuren (pBR) an. Unter Berücksichtigung aller in vivo benutzten Spaltstellen ließen sich die unterhalb des Balkens angegebenen Spaltprodukte erwarten. Die angegebenen Zahlenwerte (in kDa) beziehen sich auf eine Molekulargewichtsbestimmung der entsprechenden Virusproteine im SDS-Polyacrylamidgel nach Sangar et al. (1979). Die Molekulargewichte der NH_2 - bzw. COOH -terminalen Spaltprodukte wurden aus der von der Nukleinsäuresequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz errechnet. Ein zweites COOH -terminales Spaltprodukt ist für den Fall angegeben, daß die Spaltstelle zwischen Protease und RNA-abhängiger Polymerase nicht erkannt werden kann.

Im SDS-Polyacrylamidgel konnten nach Coomassie Brilliant Blue- (Abb. 8A und C, Spur 2) bzw. Silberfärbung (nicht gezeigt) neben dem 34 kDa-Protein keine weiteren Spaltprodukte entdeckt werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die MKSV-spezifischen Proteine im Gel von bakteriellen Proteinen überdeckt werden. Mit der verwendeten immunologischen Methode können diese Spaltprodukte nicht nachgewiesen werden, da das Anti-O₁K-Serum nur mit Proteinen reagieren kann, welche Determinanten des Hüllproteins VP1 besitzen, wie dies beim 34 kDa-Spaltprodukt der Fall ist.

Deshalb wurde versucht, die MKSV-spezifischen Proteine während der Expressionsphase mit radioaktiven Aminosäuren spezifisch zu markieren. Dazu wurden sofort nach Induktion der Expression von pPLc24, pPLVP1, pVP1-52 und pVP1-56c in M9-Minimalmedium ¹⁴C-markierte Aminosäuren (His, Leu, Thr, Phe und Pro) zugegeben. Nach 30 Minuten während der Expression wurden die Zellen lysiert. Markiertes Protein wurde nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel mittels Fluorographie nachgewiesen.

In der Abbildung 10 sieht man, daß zusätzlich zu den bei Expression von pPLc24 markierten Proteinen (Spur 4) bei pPLVP1 ein 45 kDa- und bei pVP1-52 ein 95 kDa-Protein markiert wurden (Spuren 1 und 2). Dieses Ergebnis zeigt, daß die Methode geeignet ist, um virus-spezifische Proteine zu entdecken. Zusätzlich zu dem VP1-spezifischen 34 kDa-Protein ist bei pVP1-56c im Vergleich zu pPLc24 ein 26 kDa-Protein verstärkt markiert (Spur 3). Das 26 kDa-Protein ist nicht VP1-spezifisch (nicht gezeigt). Da es von seiner Größe her mit keinem auf pVP1-56c kodierten Virusprotein übereinstimmt, handelt es sich entweder um ein unvollständig prozessiertes Virusprotein oder um ein Abbauprodukt eines E. coli-Proteins, welches von der viralen Protease erkannt und gespalten wird.

Ein möglicher Kandidat für ein MKSV-spezifisches 26 kDa-Spaltprodukt wäre ein COOH-terminales Spaltstück des Polyproteins, welches die Protease, die NH₂-terminalen

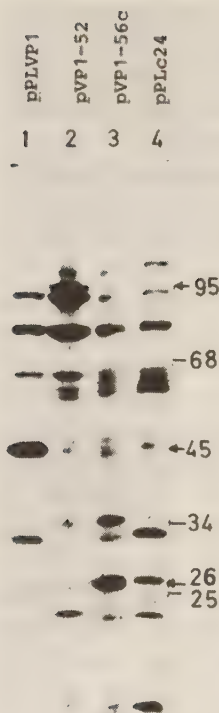


Abb. 10

In vivo ^{14}C -Markierung während der p_L -abhängigen Expression von pVP1-52, pPLVP1, pVP1-56c und pPLc24

Eine Minute nach Induktion der Expression in M9-Minimalmedium wurden ^{14}C -markierte Aminosäuren (je 10 μCi Histidin, Leucin, Threonin, Phenylalanin und Prolin) zugegeben. Nach 30 Minuten wurden die Zellen lysiert. Die Lysate wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Markiertes Protein wurde mittels Fluorographie nachgewiesen. MKSV-spezifische Proteine sind mit Pfeil und Molekulargewichtsangabe (in kDa) gekennzeichnet. Markerproteine wurden getrennt mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Ihre Position ist am Rand (in kDa) angegeben.

(1) pPLVP1; (2) pVP1-52; (3) pVP1-56c; (4) pPLc24.

Aminosäuren der RNA-abhängigen RNA Polymerase und vektorkodierte Aminosäuren enthält (siehe Abb. 9). Dies würde voraussetzen, daß die MKSV-spezifische Schnittstelle zwischen Protease und RNA-abhängiger RNA Polymerase wegen einer Konformationsänderung - bedingt durch die virusfremde Aminosäuresequenz am COOH-Ende - nicht erkannt wird.

Während sowohl das 95 kDa-Protein von pVP1-52 als auch das 140 kDa-Protein von pVP1-56c Δ (siehe Abb. 8B, Spur 1 und 8D, Spur 3) in E. coli nachgewiesen werden können, sind neben dem 34 kDa-Protein und dem möglicherweise virus-spezifischen 26 kDa-Protein keine weiteren Spaltprodukte des von pVP1-56c exprimierten Polyproteins zu entdecken. Es ist anzunehmen, daß diese Spaltprodukte in E. coli abgebaut werden. Da das 95 kDa- und das 140 kDa-Protein, welche dieselben Peptidsequenzen wie die Spaltprodukte besitzen, in E. coli stabil sind, liegt der Schluß nahe, daß die durch die proteolytischen Spaltungen neu entstehenden Peptidenden Angriffspunkte für E. coli-Exopeptidasen darstellen und den Abbau der Spaltprodukte begünstigen. Ein Grund für die Stabilität des VP1-spezifischen 34 kDa-Proteins könnte durch seine starke Hydrophobizität gegeben sein oder durch die als Schutzgruppe wirkende NH₂-terminale Sequenz der MS2-Polymerase.

3. EXKURS: BAKTERIOTOXIZITÄT MKSV-SPEZIFISCHER PROTEINE

Die im ELISA zu erkennende Abnahme VPl-spezifischer Antigene 20 Minuten nach Induktion der Expression von pVP1-56c (siehe Abb. 5) läßt sich mit den vorgestellten Daten nicht eindeutig erklären. Die Vermutung, ein Abbau der VPl-Antigene könnte die Ursache dafür sein, ist nicht befriedigend, da im Immunoblot nur ein VPl-spezifisches Protein als definierte Bande bei 34 kDa auftritt und keine weiteren VPl-spezifischen Abbauprodukte zu entdecken sind. Es wäre aber auch denkbar, daß die Expression des VPl-spezifischen Polyproteins zum Erliegen kommt, trotzdem aber E. coli-Proteine weiter produziert werden. Dies würde zu einer Verdünnung der antigenen Determinanten führen und sich bei Einsatz konstanter Proteinmengen im ELISA in einer Abnahme der Meßwerte niederschlagen. Ein Abbruch der Expression könnte durch eine bakteriotoxische Wirkung des MKSV-spezifischen Polyproteins hervorgerufen werden. Zellen, die das toxische Protein nicht exprimieren, würden weiter wachsen und zu einer Vermehrung der E. coli-Proteine beitragen.

3.1 Einfluß MKSV-spezifischer Expressionsprodukte auf das Bakterienwachstum

Ein toxischer Effekt sollte sich schnell und einfach anhand einer Wachstumskinetik feststellen lassen. Dazu wurde in parallelen Ansätzen zu verschiedenen Zeitpunkten während der Expression von pPLc24, pPLVP1, pVP1-52, pVP1-56c Δ und pVP1-56c die optische Dichte der Bakterienkulturen gemessen. Wie Abb. 11 zu entnehmen ist, verlangsamt sich mit zunehmender Größe des exprimierten MKSV-spezifischen Proteins das Wachstum der Bakterien. Während die optische

Dichte der Kultur zwischen 20 und 40 Minuten nach Induktion der Expression von pPLVP1 um 0,12 zunimmt, wird bei Expression von pVP1-52 bzw. pVP1-56c Δ nur ein Zuwachs von 0,03 gemessen. Bei Expression von pVP1-56c stoppt das Wachstum nach 20 Minuten. Die optische Dichte nimmt im Laufe der nächsten zwei Stunden geringfügig ab, bevor ein erneutes Wachstum zu bemerken ist.

Das im Vergleich zu pPLc24 und pPLVP1 stark verlangsamte Bakterienwachstum nach Induktion der Expression von pVP1-52, pVP1-56c Δ und pVP1-56c zeigt, daß die von den letzteren Plasmiden exprimierten MKSV-spezifischen Polyproteine toxisch wirken. Das erneute Ansteigen der optischen Dichte der Bakterienkultur etwa 4 Stunden nach Induktion der Expression von pVP1-56c kann mit dem Heranwachsen einer Subpopulation von Bakterien erklärt werden, welche das toxische Produkt nicht mehr exprimieren.

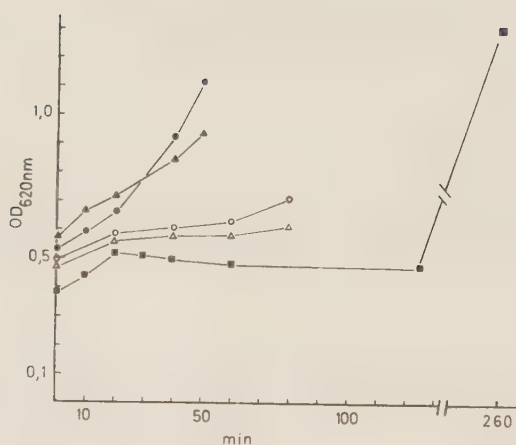


Abb. 11

Bestimmung der Bakteriotoxizität MKSV-spezifischer Proteine
 Während der Expression von pPLc24, pPLVP1, pVP1-52, pVP1-56c Δ und pVP1-56c wurden Proben aus den entsprechenden Bakterienkulturen zu verschiedenen Zeiten entnommen und die optische Dichte bestimmt.

(●) pPLc24; (▲) pPLVP1; (○) pVP1-52; (△) pVP1-56c Δ ; (■) pVP1-56c

3.2 Verlauf der Lebendkeimzahl und Revertantenrate der Bakterien in Abhängigkeit von der Expression MKSV-spezifischer Proteine

Um eine Erklärung für die Abnahme der VPl-spezifischen Antigene während des stagnierenden Bakterienwachstums bei Expression von pVPl-56c zu finden, wurden die Bakterien auf ihre Fähigkeit zur Antigenproduktion während der Expressionsphase untersucht.

Die Anwesenheit des Expressionsplasmides ist Voraussetzung für die Expression des MKSV-spezifischen Polyproteins. Da dieses Plasmid die Resistenz gegenüber Ampicillin vermittelt, stellt der Nachweis ampicillin-resistenter Bakterien einen direkten Bezug zur Expressionsfähigkeit der Bakterienkultur dar. Der Anteil VPl-Antigene exprimierender Bakterien ergibt sich aus dem Verhältnis ampicillin-resistenter Bakterien zur Gesamtzahl überlebender Bakterien. Um diesen Anteil zu bestimmen, wurden Kulturproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Expression entnommen, verdünnt und auf LB-Agar-Platten bzw. Platten, welche Ampicillin enthalten, ausgestrichen.

Auf den antibiotika-freien LB-Agar-Platten sollten alle lebensfähigen Keime, auf ampicillin-haltigen Platten nur die zur Expression MKSV-spezifischer Proteine fähigen Bakterien anwachsen.

Bei allen Plasmiden mit Ausnahme von pVPl-56c entspricht während der untersuchten Expressionsphase die Anzahl resistenter Keime der Gesamtzahl lebensfähiger Keime (Daten dazu nur von pVPl-56c gezeigt, siehe Abb. 12), d. h. alle Lebendkeime sind ampicillin-resistent.

Bei der Expression von pPLc24 steigt die Anzahl der Lebendkeime innerhalb von 50 Minuten auf das Vierfache und bleibt dann konstant (Abb. 12). Bei Expression von pPLVPl ist kein Anstieg der Keimzahl zu beobachten. Die Anzahl

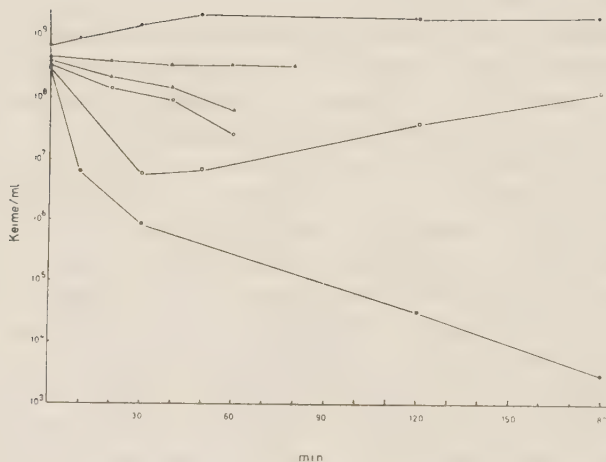


Abb. 12

Bestimmung der Lebendkeime in Bakterienkulturen während der Expression von pLVPl, pVP1-56c, pLc24, pVP1-52 und pVP1-56cΔ

Während der Expression wurden Proben von den jeweiligen Kulturen entnommen, verdünnt und auf Ampicillin-haltige LB-Agarplatten bzw. LB-Agarplatten ohne Antibiotikum (im Falle von pVP1-56c) ausgestrichen. Die erhaltenen Kolonien wurden auf die Ausgangskonzentration rückgerechnet. Ampicillin-resistente Keime von pLc24 (●), pLVPl (▲), pVP1-56c (■), pVP1-52 (○) und pVP1-56cΔ (Δ). Gesamtzahl der lebensfähigen Keime von pVP1-56c (□).

lebensfähiger Bakterien bleibt aber während der Expression konstant.

Bei Expression von pVP1-56c ist eine drastische Abnahme der ampicillin-resistenten Bakterien zu erkennen. Bereits nach 10 Minuten büßen 98% der resistenten Zellen ihre Lebensfähigkeit ein und nach 3 Stunden schließlich ist die Anzahl resistenter Keime um den Faktor 10^5 herabgesetzt.

Die Gesamtzahl der Lebendkeime nimmt innerhalb von 30 Minuten um den Faktor 50 ab und steigt dann exponentiell an. Dies läßt auf die Existenz einer Subpopulation ampicillin-sensitiver Bakterien schließen. Aufgrund des hohen Anteils von 2% 30 Minuten nach Induktion der Expression müssen ampicillin-sensitive Bakterien schon zu Beginn der Expression zugegen sein. Auf den Zeitpunkt der Induktion zurückgerechnet, beträgt der Anteil dieser Subpopulation etwa 1% an der eingesetzten Bakterienkultur.

Da die Ampicillin-Resistenz durch das Expressionsplasmid vermittelt wird, deutet die verlorengegangene Resistenz den Verlust des Expressionsplasmides an, d. h. diese Subpopulation sensitiver Bakterien sollte kein VP1-spezifisches Polyprotein produzieren können. Da mit zunehmender Expressionsdauer die Anzahl lebensfähiger resistenter Bakterien stark abnimmt, die Proteinmenge durch das Heranwachsen der Bakteriensubpopulation aber zunimmt, wird das Verhältnis von MKSV-spezifischem Protein zum Gesamtprotein kleiner. Da im ELISA die VP1-spezifischen Determinanten bei konstanter Proteinkonzentration bestimmt werden, würde dies die Abnahme der ELISA-Werte mit zunehmender Expressionsdauer erklären.

Der Anstieg der VP1-Antigendeterminanten in den ersten 20 Minuten nach Induktion der Expression von pVP1-56c (siehe Abb. 5) zeigt, daß trotz des Verlustes der Lebensfähigkeit von über 98% der exprimierenden Bakterien nach 10 Minuten die Expression in den geschädigten Zellen noch möglich ist.

Während bei Expression von pVP1-56c die Lebensfähigkeit der resistenten Zellen sofort verlorengeht (Abnahme auf 0,3%

lebensfähige Zellen nach 30 Minuten), ist sie bei Expression von pVP1-52 bzw. pVP1-56c Δ in deutlich geringerem Maße beeinträchtigt: Nach 60 Minuten sind noch 7,2% bzw. 14,2% der Zellen lebensfähig.

Die Expressionsprodukte der beiden Plasmide pVP1-56c Δ und pVP1-52 üben in etwa die gleiche Wirkung auf die Zellen aus. Dieser Effekt muß deshalb durch die Expression eines Teils des MKSV-Genoms, der beiden Plasmiden gemeinsam ist, hervorgerufen worden sein. Da bei Expression von pPLVP1 kein negativer Einfluß auf die Lebensfähigkeit der Zellen entdeckt werden kann, muß das zusätzlich zu pPLVP1 in pVP1-52 vorhandene MKSV-spezifische DNA-Fragment für eine Proteindomäne kodieren, welche zu der gezeigten Beschränkung der Lebensfähigkeit der Zellen führt. Ein Vergleich der dort kodierenden Nukleinsäuresequenzen mit der Genkarte des MKSV zeigt, daß es sich dabei um einen Proteinteil handelt, der in dem Vorläuferprotein P52 enthalten ist. Da die Funktion der von dem mittleren Teil des Genoms kodierten Virusproteine unbekannt ist, kann die Ursache für die eingeschränkte Lebensfähigkeit der Zellen aus den beschriebenen Ergebnissen nicht abgeleitet werden.

Der stark toxische Effekt, der bei pVP1-56c-abhängiger Expression auftritt, wird durch die Deletion des MKSV-spezifischen 152 bp PstI-HindIII-Fragmentes verringert. Diese Deletion führte auch zum Verlust der Proteaseaktivität des exprimierten MKSV-spezifischen Proteins (siehe dazu 2.2, Seite 33). Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen Aktivität und Bakteriotoxizität der MKSV-spezifischen Protease hin. Hemmversuche könnten darüber weiteren Aufschluß geben.

4. HEMMUNG DER MKSV-SPEZIFISCHEN PROTEASE

Aufgrund der Wirkungsweise eines die enzymatische Aktivität hemmenden Agens kann auf die Struktur des Reaktionszentrums des untersuchten Enzyms rückgeschlossen werden. Schwermetallionen können zum Beispiel durch Komplexbildung mit Aminosäureresten im aktiven Zentrum enzymatische Funktionen beeinträchtigen. Zn^{2+} -Ionen bilden mit dem Sulfhydrylrest des Cysteins starke Bindungen aus. Ist diese Aminosäure im reaktiven Zentrum, wie bei den Cysteinproteasen, wird durch Zugabe von Zn^{2+} -Ionen die Enzymaktivität gehemmt.

Die virus-spezifischen Proteasen von Poliovirus, Rhinovirus oder EMCV konnten durch Zugabe von Zn^{2+} -Ionen unterschiedlich stark inaktiviert werden (Butterworth & Korant, 1974). Vergleichbare Studien über die MKSV-Protease existieren nicht. Mit Hilfe des etablierten Prozessierungssystems in E. coli kann die Wirkung von Zn^{2+} -Ionen auf die MKSV-spezifische Proteaseaktivität untersucht werden.

4.1 Hemmung der viralen Protease mit Zn^{2+} -Ionen

Butterworth & Korant (1974) zeigten in Zellkulturexperimenten, daß die Prozessierung sekundärer Spaltstellen der Polyproteine von Rhinovirus, EMCV und Poliovirus bei Zugabe von Zn^{2+} -Ionen zum Kulturmedium in einem Konzentrationsbereich von 0,02 mM bis 1,5 mM gehemmt wird. Bei höheren Konzentrationen wirken Zn^{2+} -Ionen toxisch. So wird bereits bei einer Zn^{2+} -Ionenkonzentration von 1,2 mM im Kulturmedium die Proteinsynthese zu 80% inhibiert.

Um die günstigsten Bedingungen für die Hemmung mit Zn^{2+} -Ionen zu erhalten, wurde die Induktion der Expression von pVP1-56c in Gegenwart von 2 mM, 3 mM und 5 mM Zn^{2+} -Ionen

durchgeführt.

Bei Hemmung der viralen Proteaseaktivität sollten das nicht prozessierte MKSV-spezifische Polyprotein bzw. partiell gespaltene Vorläuferproteine nachzuweisen sein. Das Molekulargewicht des bzw. der VP1-spezifischen Polypeptide wurde im Immunoblot ermittelt.

Mit Anti-O₁K-Serum lassen sich nach Expression mit 2 mM ZnSO₄ zusätzlich zum 34 kDa-Protein mehrere Proteine mit Molekulargewichten bis zu 145000 anfärben (Abb. 13, Spur 3). Das 145 kDa-Protein entspricht dem ungespaltenen Expressionsprodukt. Die weiteren VP1-spezifischen Proteine stellen Zwischenstufen bei der Prozessierung des 145 kDa-Proteins dar.

Eine quantitative Inhibierung der viralen Proteaseaktivität in E. coli kann nicht erreicht werden. Eine weitere Erhöhung der Zn²⁺-Ionenkonzentration führt zur Unterdrückung der p_L-abhängigen Expression (Abb. 13, Spuren 1 und 2).



Abb. 13

Nachweis VPl-spezifischer Fusionsproteine von pVP1-56c nach Expression in Gegenwart von ZnSO_4

30 Minuten nach Induktion der Expression von pVP1-56c in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an ZnSO_4 wurden die Zellen lysiert. Im Immunoblot wurden VPl-spezifische Proteine mit Anti-O₁K-Serum nachgewiesen. VPl-spezifische Proteine sind mit Pfeil und Molekulargewichtsangabe gekennzeichnet.

4.2 Zn^{2+} -ionen beeinflussen die Bakteriotoxizität der viralen Protease

Das von pVP1-56c exprimierte MKSV-spezifische Polyprotein ist extrem toxisch für E. coli-Zellen. Ein Vergleich mit der Mutante pVP1-56c, welche für ein Polyprotein kodiert, das nicht mehr proteolytisch aktiv ist, hat gezeigt, daß ein Zusammenhang zwischen der Proteaseaktivität und der Bakteriotoxizität besteht. Falls die Proteaseaktivität die Ursache für die Bakteriotoxizität ist, sollte durch die Hemmung der Protease ihre toxische Wirkung verringert werden, d. h. der Anteil noch lebensfähiger Bakterien sollte sich erhöhen.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die Anzahl ampicillin-resistenter Bakterien nach Induktion der Expression von pVP1-56c bei verschiedenen Zn^{2+} -Ionenkonzentrationen bestimmt.

Wie in Abb. 14 dargestellt ist, kann durch Zugabe von Zn^{2+} -Ionen zum Kulturmedium der toxische Effekt bei Expression von pVP1-56c verringert werden. Mit zunehmender Zn^{2+} -Ionenkonzentration nimmt die Zahl überlebender Bakterien zu.

Die Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen bewirkt bei Expression von pVP1-56c zwei parallel auftretende Veränderungen. Erstens wird die proteolytische Spaltung des MKSV-spezifischen Polyproteins inhibiert und zweitens nimmt die Toxizität des Expressionsproduktes ab. Dies läßt darauf schließen, daß der toxische Effekt durch die enzymatische Aktivität der viralen Protease hervorgerufen wird. Die toxische Wirkung könnte dann auf der Degradation von E. coli-Proteinen durch diese Protease beruhen.

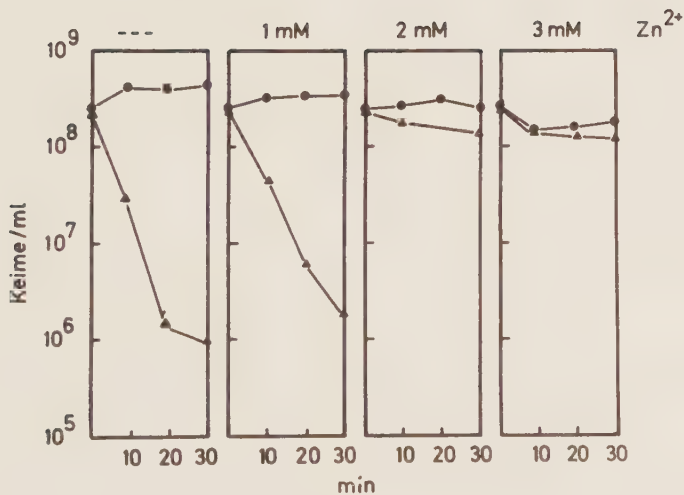


Abb. 14

Einfluß von ZnSO_4 auf die Bakteriotoxizität des MKSV-spezifischen Expressionsproduktes von pVP1-56c

Die Expression von pVP1-56c bzw. pPLc24 (Kontrolle) wurde in Gegenwart verschiedener Zn^{2+} -Ionenkonzentrationen durchgeführt. Nach 10, 20 und 30 Minuten wurden Proben entnommen, verdünnt und auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen. Die Kolonienzahl wurde auf die Anzahl der Keime pro ml Kultur umgerechnet.

(●) pPLc24; (▲) pVP1-56c.

5. EINFLUSS BENACHBARTER GENPRODUKTE AUF DIE PROTEASEAKTIVITÄT

Dem Plasmid pVP1-56c fehlen 1,7 kb MKSV-spezifischer Nukleotidsequenz vom 3'-Ende des Virusgenoms. Diese kodieren für die noch fehlenden 450 Aminosäuren der RNA-abhängige RNA Polymerase. Um herauszufinden, ob die Spezifität der Proteaseaktivität durch die COOH-terminalen Aminosäuresequenzen verändert wird, wurden die 3'-wärts liegenden MKSV-spezifischen DNA-Sequenzen in das Plasmid pVP1-56c eingefügt, so daß der virale Leserahmen um die noch fehlenden Kodons der RNA-abhängigen RNA-Polymerase ergänzt wurde.

Außerdem sollte durch Deletion von MKSV-spezifischen DNA-Sequenzen, welche für Teile des P52-Vorläuferproteins (vergleiche Abb. 15) kodieren, untersucht werden, ob die dort kodierten Peptidsequenzen für die Funktion der Protease essentiell sind.

5.1 Konstruktion der Plasmide pVP1-Pol und pVP1- Δ BglIII-Pol (siehe Abb. 15)

pVP1-Pol:

Die PstI-BamHI-Fragmente der Plasmide pFMDV217 und pFMDV512 wurden isoliert, ligiert und als PstI-Fragment in pBR322 subkloniert. Dieses PstI-Fragment wurde in die PstI-Schnittstelle des MKSV-spezifischen DNA-Teils von Plasmid pVP1-56c eingebaut. Bei richtiger Orientierung des eingebauten PstI-Fragmentes enthält der virale Leserahmen des neu konstruierten Plasmids pVP1-Pol die komplette Basensequenz vom VP1-Gen bis zum natürlichen Stoppkodon nahe dem 3'-Ende der MKSV-spezifischen Sequenz. Er kodiert für ein

MKSV-spezifisches Protein mit einem Molekulargewicht von 180000. Dieses Protein enthält die virale Protease in ihrer natürlichen Umgebung, eingeschlossen von den im Viruspolyprotein benachbarten Polypeptidsequenzen.

pVP1- Δ BglIII-Pol:

Das Plasmid pVP1- Δ BglIII-Pol wurde von Herrn Dr. O. Marquardt konstruiert und zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pVP1-Pol besitzt zwei BglIII-Schnittstellen in der MKSV-spezifischen DNA-Sequenz. Das von ihnen begrenzte DNA-Fragment ist 1059 bp groß und kodiert für einen großen Teil des P52-Vorläuferproteins. Dieses BglIII-Fragment wurde durch BglIII-Verdau mit anschließender Religation des Vektorfragmentes in verdünnter Lösung deletiert. Auf Grund von DNA-Sequenzdaten (Forss, 1983) war anzunehmen, daß nach Deletion dieses DNA-Fragmentes der virale Leserahmen erhalten bleibt. Das von pVP1- Δ BglIII-Pol kodierte Protein hat ein Molekulargewicht von 140000.

5.2 MKSV-spezifische Expressionsprodukte von pVP1-Pol und pVP1- Δ BglIII-Pol

Die Expressionsprodukte der beiden neu konstruierten Plasmide pVP1-Pol und pVP1- Δ BglIII-Pol wurden im Immunoblot mit Anti-O₁K-Serum nachgewiesen. Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, werden in beiden Fällen Proteine spezifisch angefärbt (Spuren 3 und 4), welche mit dem VP1-spezifischen 34 kDa-Protein von pVP1-56c (Spur 2) komigrieren. Das Auftreten identischer VP1-spezifischer Spaltprodukte nach Expression von pVP1-56c, pVP1-Pol und pVP1- Δ BglIII-Pol beweist, daß für die Aktivität der viralen Protease benachbarte MKSV-spezifische Proteinteile nicht essentiell sind bzw. keine die Spezifität beeinflussende Wirkung ausüben.

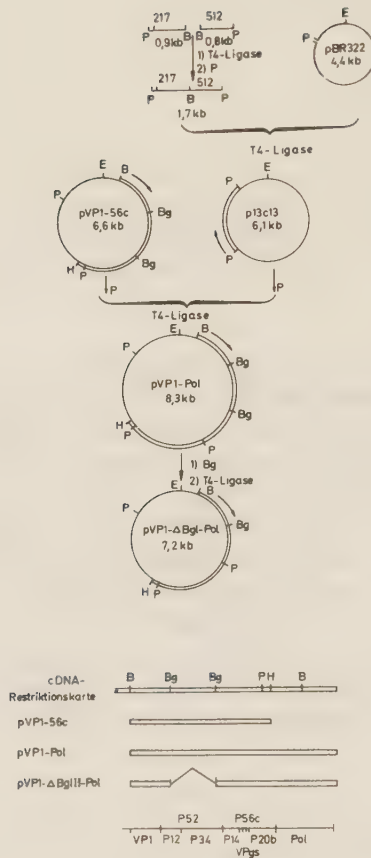


Abb. 15

Konstruktion der Plasmide pVP1-Pol und pVP1- Δ BglII-Pol

Konstruktion von pVP1-Pol: Die PstI-BamHI-cDNA-Fragmente der Plasmide pFMDV217 und pFMDV512 wurden isoliert, miteinander ligiert und in das mit PstI linearisierte Plasmid pBR322 inseriert. Aus den resultierenden Plasmid p13c13 wurde das PstI-cDNA-Fragment isoliert und in die PstI-Schnittstelle der cDNA des Plasmides pVP1-56c eingebaut.

Konstruktion von pVP1- Δ BglII-Pol: Das Plasmid pVP1-Pol wurde mit BglII verdaut, wobei zwei DNA-Fragmente entstehen. Religation nach Verdünnung führt zum Verlust des kleinen BglII-Fragmentes.

Unterhalb der Konstruktionszeichnung ist eine Korrelation der rekombinanten cDNA-Fragmente mit der cDNA-Restriktionskarte und der Genkarte des MKSV dargestellt.

Die für die Konstruktionen relevanten Schnittstellen sind angegeben (P=PstI; B=BamHI; Bg=BglII). Die Größe der Plasmide und DNA-Fragmente ist in kbp angegeben. Die Orientierung des MKSV-spezifischen Leserahmens ist mit Pfeilen gekennzeichnet.

1 2 3 5 2 4

45 →

← 34 →

Abb. 16

Vergleich der MKSV-spezifischen Expressionsprodukte von pVP1- Δ BglIII-Pol und pVP1-Pol mit pVP1-56c

30 bis 60 Minuten nach Induktion der Expression von pVP1-Pol, pVP1- Δ BglIII-Pol bzw. pVP1-56c wurden die Zellen lysiert. Im Immunoblot wurden die VP1-spezifischen Proteine mit Anti-O₁K-Serum nachgewiesen. Die Position des VP1-spezifischen Proteins ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

(1) pPLc24; (2) pVP1-56c; (3) pVP1- Δ BglIII-Pol; (4) pVP1-Pol; (5) pPLVP1

6. SPALTUNG EINES UNABHÄNGIG SYNTHETISIERTEN SUBSTRATS DURCH DIE VIRALE PROTEASE

Die oben vorgestellten Plasmide exprimieren MKSV-spezifische Polyproteine, welche gleichzeitig das die Proteolyse katalysierende aktive Zentrum und sein Substrat enthalten. Es stellt sich nun die Frage, ob die Prozessierung auch stattfinden kann, wenn Protease und Spaltstelle auf verschiedenen Molekülen liegen. Um diese Frage beantworten zu können, mußten die Protease und ihr Substrat getrennt exprimiert werden. Dies ließ sich durch eine Plasmidkonstruktion mit zwei Expressionseinheiten erreichen, welche beide für MKSV-spezifische Polyproteine kodieren, von denen aber nur eines die virale Protease enthält.

Konstruktion von Plasmid 1.11:

Bei der Rekombination von MKSV-spezifischen DNA-Fragmenten wurde in zwei Stufen das Plasmid 1.11 erhalten (siehe Abb. 17). Das im ersten Schritt entstandene Plasmid VIII7 enthält die viralen DNA-Sequenzen in falscher Orientierung. Nach einer zweiten Rekombination wurde das Plasmid 1.11 isoliert. Dieses ist ein dimeres Expressionsplasmid mit zwei Expressionseinheiten, welche für zwei verschieden große MKSV-spezifische Proteine (45 kDa und 180 kDa) kodieren. Das 180 kDa Polyprotein enthält die virale Protease.

Beide Proteine sollten Substrate für die virale Protease darstellen und bei der Proteolyse das VP1-spezifische 34 kDa-Protein freisetzen, falls die Protease einen "Trans"-Effekt zeigt.

Nach Induktion der P_L -abhängigen Proteinsynthese von 1.11 ist im Immunoblot nur das 34 kDa-Protein mit Anti- O_1K -Serum spezifisch anfärbbar (Abb. 18, Spur 1). Das Auftreten des 34 kDa-Proteins beweist, daß vom langen viralen Leserahmen ein

Polyprotein mit Proteaseaktivität exprimiert wird. Um sicherzustellen, daß der zweite Leserahmen tatsächlich exprimiert und das resultierende 45 kDa-Protein zum 34 kDa-Protein prozessiert wird, muß das 45 kDa-Vorläuferprotein nachgewiesen werden.

Dies wird durch Hemmung der Protease erreicht. Nach Induktion der Expression in Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen können im Immunoblot zusätzlich zum 34 kDa Protein die unprozessierten MKSV-spezifischen 45 kDa- und 180 kDa-Proteine angefärbt werden (Abb. 18, Spuren 2 und 3).

Die virale Protease besitzt somit die Fähigkeit, auch Substrate zu prozessieren, die nicht Bestandteil der gleichen Aminosäurekette sind. Diese werden ebenso schnell und effizient hydrolysiert wie die hochmolekularen Vorläuferproteine, welche die Protease enthalten.

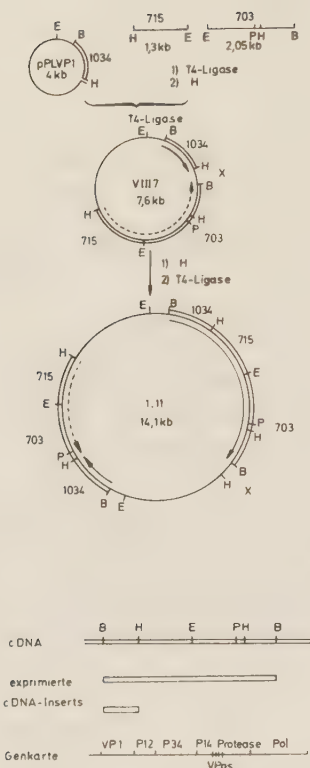


Abb. 17

Konstruktion von Plasmid 1.11

Nach Ligation der MKSV-spezifischen DNA-Fragmente der Plasmide pFMDV715 und pFMDV703 mit dem mit HindIII linearisierten Plasmid pPLVP1 wurde das Plasmid VIII7 isoliert. Nach HindIII-Verdau und anschließender Religation wurden das Plasmid 1.11 erhalten.

Die für die Konstruktion von VIII7 und 1.11 relevanten und für die Zuordnung der DNA-Fragmente notwendigen Schnittstellen sind angegeben (H=HindIII; B=BamHI; E=EcoRI; P=PstI). Die MKSV-spezifischen DNA-Fragmente sind mit den Bezeichnungen der Plasmide, aus denen sie ursprünglich isoliert worden waren, versehen. Das Fragment X ist kein MKSV-spezifisches DNA-Fragment, wurde aber per Zufall bei der Plasmidkonstruktion mit eingebaut. Die Pfeile geben die Orientierung der MKSV-spezifischen DNA-Fragmente an (gestrichelter Pfeil bedeutet Orientierung entgegengesetzt zur Translationsrichtung).

Unterhalb der Konstruktionszeichnung ist die Korrelation der MKSV-spezifischen DNA-Fragmente von 1.11 mit der cDNA-Restriktionskarte und der Genkarte des MKSV dargestellt.

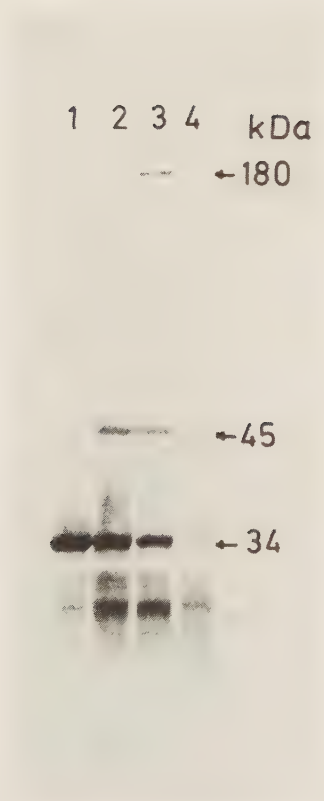


Abb. 18

Nachweis MKSV-spezifischer Expressionsprodukte von 1.11
 30 Minuten nach Induktion der Expression von 1.11 wurden die Zellen lysiert. Die Expression wurde ohne (1) bzw. in Gegenwart von 1 mM (2), 2 mM (3) und 3 mM (4) ZnSO_4 durchgeführt. Im Immunoblot wurden VP1-spezifische Proteine mit Anti-O₁K-Serum nachgewiesen. Die Position der VP1-spezifischen Fusionsproteine ist mit Pfeilen und den Molekulargewichten (in kDa) gekennzeichnet.

7. AUSBAU DES PROZESSIERUNGSSYSTEMS

Das VPl-spezifische 34 kDa-Protein ist das einzige Spaltprodukt, welches nach der Prozessierung der verschiedenen in E. coli exprimierten MKSV-spezifischen Polyproteine stabil ist und mit Anti-O₁K-Serum spezifisch nachgewiesen werden kann. Um ein Prozessierungsschema zumindest für einen Teil des viralen Polyproteins aufstellen zu können, ist es notwendig, weitere stabile Spaltprodukte zu erhalten.

Es bietet sich an, den MKSV-spezifischen Teil des in E. coli exprimierten Polyproteins um die angrenzenden Peptidsequenzen der Virushüllproteine zu ergänzen, und somit neue Spaltstellen, zum Beispiel die zwischen VP3 und VPl, einzuführen. Die neu eingefügten Peptidsequenzen sollten nach erfolgter Prozessierung durch die NH₂-terminale MS2-Polymerase-Sequenz bzw. durch den hydrophoben Charakter der Hüllproteine vor Abbau durch E. coli-Peptidasen geschützt sein. Spaltet die virale Protease im Bereich der Virushüllproteine, wie eigentlich zu erwarten ist (Grubman & Baxt, 1982, siehe dazu Abb. 1), sollten weitere Spaltprodukte auftreten und aus den oben genannten Gründen in E. coli stabil und folglich nachzuweisen sein.

Die MKSV-spezifische, in den Expressionsvektoren insertierte DNA-Sequenz wurde deshalb in 5'-Richtung um ein cDNA-Fragment verlängert, welches das VPl-Gen vervollständigt und zusätzlich die kodierende Sequenz für 207 Aminosäuren des VP3 enthält, sodaß im Translationsprodukt die Spaltstelle zwischen den Hüllproteinen VP3 und VPl neu hinzukommen sollte. Mit Hilfe dieser neuen Konstruktion sollte überprüft werden, ob diese Spaltstelle im Polyprotein von der viralen Protease erkannt wird.

7.1 Konstruktion der Plasmide pPLVP3 und pVP3-Pol (Abb. 19)

Die VP3-spezifische DNA-Sequenz wurde zuerst in das Expressionsplasmid pPLc24 subkloniert. In das neu konstruierte Plasmid pPLVP3 wurde anschließend ein MKSV-spezifisches DNA-Fragment eingebaut, welches die viralen Gene von VP1 bis einschließlich der Protease und eines Teils der Polymerase enthält.

pPLVP3:

Das 646 bp große BstEII-BamHI-Fragment aus pFMDV1448 (vergleiche Abb.2 und 19) kodiert für den COOH-terminalen Teil des Hüllproteins VP3 und die ersten acht NH₂-terminalen Aminosäurereste des Hüllproteins VP1 (Sequenzdaten von Forss, 1983). Um dieses DNA-Fragment so in das Plasmid pPLc24 einzubauen, daß eine Fusion des MS2-Polymerase-Leserahmens mit dem MKSV-Leserahmen erreicht wird, wurde ein Teil des MS2-Fragmentes von pPLc24 deletiert.

Das Plasmid pPLVP3 kodiert für ein Fusionsprotein mit 58 MS2-spezifischen, 207 VP3-spezifischen, 8 VP1-spezifischen und 23 vektorkodierten Aminosäureresten. Das Molekulargewicht des Fusionsproteins wurde zu 30000 kalkuliert.

pVP3-Pol:

Die einzige BamHI-Schnittstelle im Plasmid pPLVP3 befindet sich am 3'-Ende der insertierten MKSV-spezifischen DNA-Sequenz. In diese Schnittstelle wurde das 4,2 kb MKSV-spezifische BamHI-Fragment von pVP1-Pol eingefügt. Bei richtiger Orientierung ergibt sich ein Leserahmen von 5 kb Länge, welcher für ein MKSV-spezifisches Polyprotein von 180 kDa kodiert.

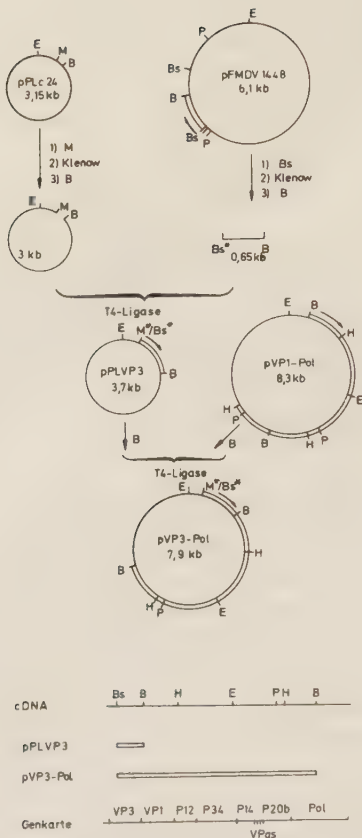


Abb. 19

Konstruktion von pPLVP3 und pVP3-Pol

Konstruktion von pPLVP3: Aus dem Plasmid pFMDV1448 wurde das 1059 bp BstEII-cDNA-Fragment isoliert. Nach Auffüllen der Enden wurde das Fragment mit BamHI nachgeschnitten. Das Expressionsplasmid pPLc24 wurde mit MstII linearisiert, nach Auffüllen der Enden mit BamHI nachgeschnitten und mit dem VP3-spezifischen BamHI-BstEII*-cDNA-Fragment ligiert.

Konstruktion von pVP3-Pol: In das mit BamHI linearisierte Plasmid pPLVP3 wurde das MKSV-spezifische BamHI-cDNA-Fragment aus Plasmid pVP1-Pol eingebaut. Die Orientierung des Inserts wurde durch Restriktionsverdau überprüft.

Die für die Konstruktion relevanten Schnittstellen sind angegeben (Bs=BstEII; B=BamHI; M=MstII). Aufgefüllte Schnittstellen sind mit * gekennzeichnet. Die Orientierung des MKSV-spezifischen Leserahmens ist mit Pfeilen gekennzeichnet.

Unterhalb der Konstruktionszeichnung ist die Korrelation der MKSV-spezifischen cDNA-Fragmente von pPLVP3 und pVP3-Pol mit der cDNA-Restriktionskarte und der Genkarte von MKSV dargestellt.

7.2 MKSV-spezifische Expressionsprodukte von pLVP3 und pVP3-Pol

Die korrekte Fusion des Leserahmens der MS2-Polymerase mit dem des VP3-Hüllproteins sollte durch die Analyse des Expressionsproduktes von pLVP3 bestätigt werden. Nach Induktion der Expression von pLVP3 ist nach Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel im Vergleich zur Kontrolle (Expression von pLc24; Abb. 20A, Spur 2) eine zusätzliche Bande bei 30 kDa zu beobachten (Abb. 20A, Spur 1). Die Größe dieses Proteins stimmt mit dem aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Molekulargewicht überein.

Dieses Protein läßt sich im Immunoblot mit Anti-O₁K-Serum nicht spezifisch anfärben (Abb. 20B, Spur 2). Dies könnte auf einer Konformationsänderung im 30 kDa-Fusionsprotein beruhen, welche die Ausbildung VP3-spezifischer, auf dem Viruspartikel vorliegender Antigen determinanten verhindert. Der Nachweis der VP3-spezifischen Peptidsequenzen gelang aber indirekt mit Hilfe von Antikörpern, die gegen das aus Polyacrylamidgelen isolierte 30 kDa-Protein in Kaninchen induziert wurden. Diese Antikörper erkennen im Immunoblot neben dem aus E. coli gereinigten 30 kDa-Fusionsprotein (Abb. 20B, Spur 5) spezifisch das Hüllprotein VP3 des MKSV (Abb. 20B, Spur 3). Da das 30 kDa-Fusionsprotein auch Peptidsequenzen der MS2-Polymerase enthält, reagieren die gegen dieses Protein gerichteten Antikörper auch mit der MS2-Domäne des von pLVP1 exprimierten 45 kDa-Proteins (Abb. 20B, Spur 4).

Diese Antikörper stellen demnach ein nützliches Werkzeug dar, um jegliche Fusionsproteine, welche das NH₂-Ende der MS2-Polymerase enthalten, nachzuweisen.

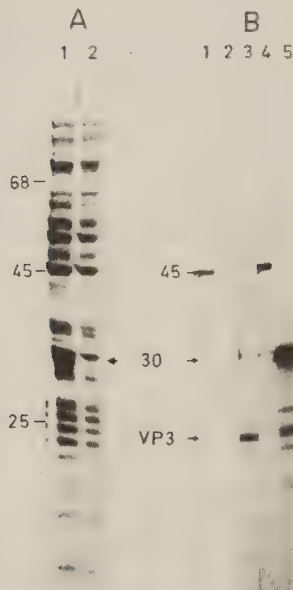


Abb. 20

Nachweis des p_L -abhängigen Expressionsproduktes von pPLVP3
 A) Eine Stunde nach Induktion der Expression von pPLVP3 wurden die Zellen lysiert. Die Lysate wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. (1) pPLVP3, (2) pLc24.

B) Immunoblot. Die von pPLVP1 bzw. pPLVP3 exprimierten Fusionsproteine wurden aus Bakterienlysaten isoliert (siehe Methoden 2.15). Jeweils 0,4 μ g der isolierten Proteine wurden für den Immunoblot eingesetzt. Zur Kontrolle der gegen das von pPLVP3 exprimierte Fusionsprotein induzierten Antikörper wurde 1 μ g MKSV (O_1K) eingesetzt.

(1) und (4) Expressionsprodukt von pPLVP1; (2) und (5) Expressionsprodukt von pPLVP3; (3) MKSV (O_1K).

Die Nitrozellulosestreifen (1) und (2) wurden mit Anti- O_1K -Serum behandelt, die Nitrozellulosestreifen (3), (4) und (5) wurden mit Antikörpern behandelt, welche gegen das Expressionsprodukt von pPLVP3 gerichtet sind.

MKSV-spezifische Fusionsproteine und das Virushüllprotein sind mit Pfeil und Molekulargewicht (in kDa) gekennzeichnet. Die Position von Markerproteinen ist links am Rand angegeben.

Anti- O_1K -Serum erkennt das von pPLVP1 exprimierte Fusionsprotein, aber nicht das von pPLVP3. Die Antikörper, welche gegen dieses Fusionsprotein gerichtet sind, erkennen aber das Virushüllprotein VP3.

Durch den Einbau des BamHI-Fragmentes von pVP1-Pol in pPLVP3 sollte der virale Leserahmen um 4,2 kb verlängert werden und nunmehr das Gen für die Protease enthalten. Nach Induktion der Expression von pVP3-Pol ist als Beweis der korrekten Fusion des Leserahmens zu erwarten, daß das MKSV-spezifische Polyprotein proteolytisch aktiv ist und daher, wie in Kapitel 3 gezeigt, für die Zelle toxisch ist. Deshalb wurde während der Expression von pVP3-Pol und pPLVP3 (als Kontrolle) das Wachstum der Bakterienkulturen verfolgt. Während bei Expression von pPLVP3 die optische Dichte der Bakterienkultur während des untersuchten Zeitraumes steigt, bricht das Wachstum bei Expression von pVP3-Pol nach 20 Minuten ab (Abb. 21).

Dieses Experiment zeigt, daß ein toxisches Produkt von pVP3-Pol exprimiert wird. Dieser schnelle Test bietet somit einen indirekten Hinweis für die toxisch wirkende Aktivität der viralen Protease, sodaß angenommen werden kann, daß der virale Leserahmen von pVP3-Pol korrekt rekonstituiert worden ist.

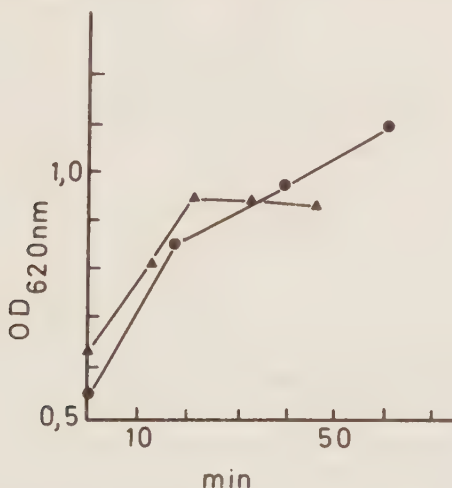


Abb. 21

Verlauf des Bakterienwachstums bei Expression von pVP3-Pol und pPLVP3

Zu verschiedenen Zeitpunkten während der Expression von pVP3-Pol und pPLVP3 (Kontrolle) wurden Proben entnommen und ihre optische Dichte bei 620 nm bestimmt.

(▲) pVP3-Pol; (●) pPLVP3.

Falls die virale Protease zusätzlich die Schnittstelle zwischen VP3 und VP1 im Polyprotein erkennt, so wäre nach proteolytischer Spaltung ein VP3-spezifisches Fusionsprotein von 29 kDa und das vollständig prozessierte VP1 von 24 kDa zu erwarten (vergleiche Abb. 22C). Wird diese Spaltstelle nicht erkannt, so wäre – unter der Annahme, daß die Proteolyse des restlichen Proteinteils analog zu den bereits vorgestellten Konstruktionen verläuft – ein 53 kDa-Fusionsprotein zu erwarten, welches die VP3- als auch die VP1-Domäne enthält (siehe Abb. 22B).

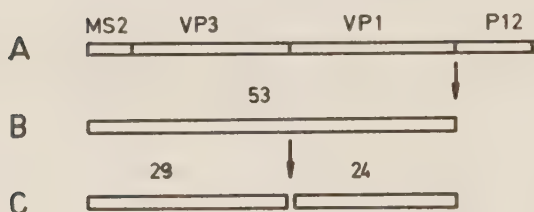


Abb. 22

Bei Prozessierung des pVP3-Pol-spezifischen Polyproteins zu erwartende Spaltprodukte

A) Der NH_2 -terminale Bereich des auf pVP3-Pol kodierten MKSV-spezifischen Polyproteins.

B) und C) Spaltprodukte, die bei Spaltung an in vivo erkannten Spaltstellen zu erwarten wären.

Die Molekulargewichte der angegebenen Spaltprodukte sind aus der Länge der kodierenden DNA-Sequenz abgeleitet.

Nach Behandlung mit Anti-O₁K-Serum im Immunoblot sollten sich diejenigen Spaltprodukte nachweisen lassen, die VP1-spezifische Antigendeterminanten enthalten. Aus dem Molekulargewicht der angefärbten Proteine kann dann rückgeschlossen werden, welche der in Abb. 22 dargestellten Spaltungsmöglichkeiten zutrifft.

Im Immunoblot werden drei verschiedene Proteine mit Molekulargewichten von 58000, 41000 und 28000 zusätzlich zur Kontrolle (Zellysat vor Expression von pVP3-Pol; Abb. 23A, Spur 1) intensiv angefärbt (Abb. 23A, Spur 2). Bei Hemmung der Proteolyse mittels Zn²⁺-ionen treten zusätzliche VP1-spezifische höhermolekulare Zwischenprodukte und das ungespaltene 180 kDa-Translationsprodukt auf. Mit steigender Zn²⁺-ionenkonzentration ist eine Abnahme der kleineren VP1-spezifischen Proteine zu beobachten (Abb. 23A, Spuren 3 und 4). Dies beweist, daß die 58 kDa-, 41 kDa- und 28 kDa-Proteine Spaltprodukte des MKSV-spezifischen Polyproteins darstellen.

Das Auftreten der Bande bei 58 kDa läßt sich durch die Spaltung des Polyproteins zwischen VP1 und P12 erklären (zu erwarten wäre ein Spaltprodukt mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 53000, vergleiche Abb. 22B). Es ist anzunehmen, daß an derselben Position gespalten wird wie bei der Prozessierung der pVP1-56c-, pVP1-Pol- bzw. pVP1- Δ BglIII-Pol-spezifischen Polyproteine, die zur Freisetzung des VP1-spezifischen 34 kDa-Proteins führt. Die Spaltung zwischen VP1 und P12 erfolgt quantitativ, da keine höhermolekularen MKSV-spezifischen Banden mit nennenswerter Färbung im Immunoblot zu sehen sind. Da das 58 kDa-Protein den gesamten antigenen Bereich der exprimierten Hüllproteine enthält, müssen die weiteren spezifisch angefärbten Banden Spaltprodukte dieses 58 kDa-Proteins darstellen. Da die Bande bei 58 kDa trotz der erfolgenden Proteolyse des 58 kDa-Proteins, die zur Freisetzung der weiteren Produkte führt, am stärksten angefärbt wird, können die weiteren Spaltungen nur mit geringer Effizienz auftreten.

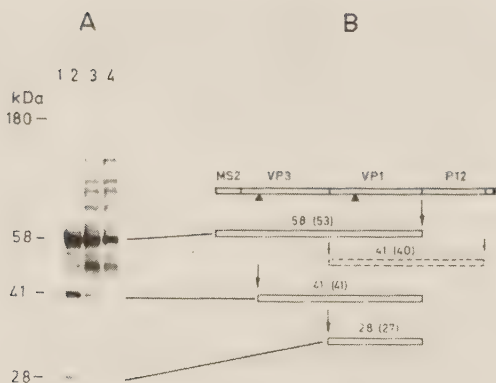


Abb. 23

Nachweis MKSV-spezifischer Proteine nach Expression von pVP3-Pol und ihre Kartierung

A) Immunoblot von Zellysaten nach Expression von pVP3-Pol (1) vor bzw. (2) 50 Minuten nach Induktion der Expression von pVP3-Pol, (3) in Gegenwart von 1 mM bzw. (4) 2 mM Zn^{2+} -ionen. Der Immunoblot wurde mit Anti-O₁K-Serum behandelt.

B) Kartierung der Spaltprodukte. Das NH₂-Ende des primären Translationsproduktes von pVP3-Pol ist dargestellt. Die Domänen der einzelnen Genprodukte sind gekennzeichnet (MS2=MS2-Polymerase). Die Spaltstellen sind mit Pfeilen angegeben. Die Positionen der Glu/Gly-Aminosäurepaare (▲) in dem abgebildeten Bereich der Polyproteine sind ebenfalls angegeben. Über den Spaltprodukten sind die im Immunoblot bestimmten Molekulargewichte angegeben, in Klammern die kalkulierten bzw. in Veröffentlichungen angegebenen Werte.

Das am zweitstärksten angefärbte Spaltprodukt hat ein Molekulargewicht von 41000. Unter Berücksichtigung der bei der Prozessierung des viralen Polyproteins benutzten Spaltstellen läßt sich zwar das VP1-P12-Addukt (vergleiche Abb. 23B) als mögliches Spaltprodukt formulieren, dagegen spricht aber, daß die Spaltung zwischen VP1 und P12 in allen untersuchten Fällen quantitativ erfolgt, d. h. daß bei Expression von pVP1-56c, pVP1- Δ BglII-Pol und pVP1-Pol kein analoges MS2-VP1-P12-Produkt nachgewiesen werden kann. Das 41 kDa-Protein kann demnach nur durch eine Spaltung des 58 kDa-Proteins in der VP3-Domäne entstanden sein (siehe Abb. 23B). Diese Spaltung könnte zwischen einem Glu/Gly-Paar erfolgen, welches von Forss et al. (1984) als die häufigste von der viralen Protease benutzte Spaltsequenz im MKSV-spezifischen Polyprotein postuliert wird. Sie ordneten die Virusproteine mit Hilfe bekannter Peptidsequenzen (NH₂- und COOH-terminale Sequenzen der Virushüllproteine, NH₂-terminale Sequenzen von den Nichtstrukturproteinen P52, P12, P34, P14, P20b und P56) unter Berücksichtigung ihrer translatorischen Reihenfolge und der ermittelten Molekulargewichte der Aminosäuresequenz* des MKSV-spezifischen Polyproteins zu. Das aufgrund dieser Korrelation aufgestellte Spaltungsschema ergibt, daß das MKSV-spezifische Polyprotein (O₁K-Stamm) an 12 Stellen gespalten werden sollte, wobei 6 dieser Spaltstellen Glu/Gly-Paare wären. Da insgesamt 14 Glu/Gly-Paare in der Peptidsequenz des Polyproteins vorkommen, würden 8 Glu/Gly-Paare nicht gespalten werden. Diese 8 Glu/Gly-Paare befinden sich inmitten von Virusproteindomänen, könnten aber potentielle Spaltstellen darstellen. In dem hier untersuchten Fall könnte die Glu/Gly-Sequenz in der VP3-Domäne in einer zur Spaltung günstigeren Konformation vorliegen, falls die Fusion des MS2-Polymerasepeptids mit der VP3-Domäne eine

* Die Aminosäuresequenz wurde aus der bekannten Nukleinsäuresequenz der klonierten cDNA des MKSV (Stamm O₁K) abgeleitet.

dementsprechende Änderung der Konformation bewirkt hat. Bei einer Spaltung des 58 kDa-Proteins an der Glu/Gly-Sequenz im VP3 würde das größere der dabei freigesetzten Proteine das COOH-Ende des VP3 und das vollständige VP1 enthalten und hätte ein kalkuliertes Molekulargewicht von 41000.

Eine Spaltung des 58 kDa-Proteins zwischen VP3 und VP1 würde zu Spaltprodukten mit Molekulargewichten von 29000 (MS2-VP3) bzw. 24000 (VP1) führen. Aus der Arbeit von Strohmaier et al. (1982) kann man entnehmen, daß das VP1 von O₁K in SDS-Polyacrylamidgelen mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 27 kDa läuft. Somit könnte die spezifisch angefärbte Bande bei 28000 dem Hüllprotein VP1 entsprechen. Tatsächlich komigriert das 28 kDa-Protein mit dem Hüllprotein VP1 des O₁K-Virus in der Gelelektrophorese (Abb. 24).

Im Immunoblot werden neben den intensiv gefärbten 58 kDa-, 41 kDa- und 28 kDa-Proteinbanden noch weitere Proteinbanden schwach angefärbt. Bei einem Molekulargewicht größer als 58000 könnten diese Banden auf einer nur partiell erfolgten Proteolyse durch die virale Protease beruhen. Das Auftreten von Banden mit Molekulargewichten kleiner als 58000 könnte auf Nebenreaktionen beruhen, welche durch E. coli-eigene Proteasen als auch durch die Virusprotease katalysiert werden könnten. Diese Banden wurden deshalb bei der Aufstellung des Prozessierungsschemas außer acht gelassen.

Die drei VP1-spezifischen 58 kDa-, 41 kDa- und 28 kDa-Spaltprodukte des von pVP3-Pol exprimierten Polyproteins lassen sich, wie gezeigt, in ein Prozessierungsschema einordnen, welches mit dem in Abb. 22 vorgeschlagenen Schema übereinstimmt, aber zusätzlich eine weitere Spaltung in der VP3-Domäne erfordert.

Korreliert man die Bereiche der Spaltstellen mit der Aminosäuresequenz des viralen Polyproteins, so stellt man fest, daß drei verschiedene Spaltsequenzen von der

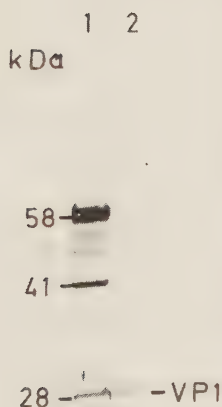


Abb. 24

Vergleich der von pVP3-Pol exprimierten VP1-spezifischen Spaltprodukte mit dem Virushüllprotein VP1 im Immunoblot
 (1) Bakterienlysate 50 Minuten nach Expression von pVP3-Pol
 (2) 1 µg MKSV (O₁K)

Die Nitrozellulosestreifen wurden mit Anti-O₁K-Serum behandelt.

Die Spaltprodukte und das Hüllprotein VP1 sind mit Molekulargewichtsangabe (in kDa) gekennzeichnet.

Das 28 kDa-Protein komigriert mit dem Hüllprotein VP1.

MKSV-spezifischen Protease erkannt werden (die vermuteten Spaltsequenzen sind in Tab. I mit den flankierenden Aminosäuresequenzen des Polyproteins (Forss et al.; 1984) dargestellt). Neben der primären Spaltsequenz spielt demnach die Tertiärstruktur des Substrates bei der proteolytischen Spaltung durch die MKSV-spezifische Protease eine wichtige Rolle.

Tabelle I

Vergleich der potentiell benutzten Spaltsequenzen und flankierender Sequenzen

- 1) Cys Pro Thr Phe Leu Arg Phe Glu/Gly Gly Val Pro Tyr Val Thr Thr
 - 2) Leu Pro Val Asp Ala Arg Ala Glu/Thr Thr Ser Ala Gly Glu Ser Ala
 - 3) Val Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu/Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
- 1) potentielle Spaltsequenz in der VP3-Domäne
 - 2) in vivo Spaltsequenz zwischen VP3 und VP1
 - 3) in vivo-Spaltsequenz am COOH-Ende von VP1

Die potentiellen Spaltstellen, welche von der viralen Protease auf dem viralen, in E. coli exprimierten Polyprotein im Bereich der Hüllprotein-Domänen erkannt werden (siehe Prozessierungsschema, Abb. 23B) sind mit ihren flankierenden Bereichen aufgelistet. Aus dieser Tabelle geht hervor, daß die virale Protease drei verschiedene Spaltsequenzen erkennt, da im Bereich der Spaltstellen keine gemeinsamen Sequenzen auftreten.

D DISKUSSION

Picornaviren haben eine besondere Strategie entwickelt, um eine koordinierte Produktion viraler Proteine zu erreichen. Die kodierenden Sequenzen sind auf dem Virusgenom zu einem ca. 7 kb langen Leserahmen fusioniert und werden in ein virales Polyprotein translatiert, von welchem durch limitierte Proteolyse die reifen viralen Proteine freigesetzt werden. Neben Proteasen der Wirtszelle ist auch eine viruskodierte Protease an der Prozessierung des Polyproteins beteiligt.

In infizierten Zellkulturen oder nach in vitro Translation viraler RNA läßt sich der proteolytische Abbau des viralen Polyproteins verfolgen. Die gleichzeitige Präsenz aller an der Prozessierung beteiligter Proteasen erschwert aber die Charakterisierung der einzelnen proteolytischen Schritte.

Um die virale Protease und ihre spezifische Aktivität erforschen zu können, wurde ein System gesucht, welches die Prozessierung des viralen Proteins in Abhängigkeit von der viralen Protease, aber getrennt von den zellulären Proteasen erlaubt. Dazu war es notwendig, zumindest Teilsequenzen des viralen Polyproteins zu exprimieren, welche die Protease und zugleich von ihr erkannte Spaltstellen als Substrat enthalten, um dann dessen autokatalytische Prozessierung studieren zu können.

1. Expression MKSV-spezifischer Proteine in E. coli und Nachweis der MKSV-spezifischen Proteaseaktivität

Es wurde untersucht, ob die virale Protease in E. coli exprimiert werden kann und dort enzymatisch aktiv ist.

Für die Expression viraler Proteine in E. coli standen MKSV

O₁K cDNA Klone und geeignete Expressionsvektoren (pPLc24, pPLVP1) zur Verfügung (Küpper et al., 1981; Remaut et al., 1981). Bei Verwendung dieser Vektoren ist die Expression MKSV-spezifischer Proteine abhängig vom linken Promoter p_L von λ und wird durch den temperatursensitiven Repressor cI857 reguliert, so daß die p_L-abhängige Expression bei 28°C unterdrückt und durch Temperaturerhöhung auf 42°C induziert werden kann.

Die Verwendung eines induzierbaren Expressionssystems ist unabdingbar, wenn Systeme verwendet werden, die hohe Expressionsraten ermöglichen bzw. wenn Proteine exprimiert werden, die bakteriotoxisch wirken können, wie zum Beispiel Nukleinsäure- oder Protein-abbauende Enzyme.

Ausgehend von den Expressionsvektoren pPLc24 und pPLVP1 wurde eine Serie von Plasmiden konstruiert, welche verschiedenen lange cDNA-Fragmente des MKSV-Genoms mit der VP1-spezifischen Sequenz aus pPLVP1 als gemeinsamem 5'-Ende enthalten. Mit zunehmender Länge des Leserahmens sollte die Produktgröße solange zunehmen, bis der Leserahmen für die Protease erreicht ist. Ist die virale Protease als Bestandteil des exprimierten Polyproteins proteolytisch aktiv und katalysiert sie die spezifische Prozessierung dieses Polyproteins, sollten anstelle des Polyproteins virus-spezifische Spaltprodukte nachzuweisen sein.

Alle Plasmide dieser Serie kodieren für Polyproteine mit identischen NH₂-Enden. Die NH₂-terminale Sequenz beginnt mit den 99 Aminosäuren der MS2-Polymerase, an die sich MKSV-spezifische Sequenzen, beginnend mit den antigenen Determinanten des Hüllproteins VP1, anschließen. Mit Anti-O₁K-Antikörpern, welche die VP1-spezifischen Antigendeterminanten erkennen, konnten die MKSV-spezifischen Polyproteine nachgewiesen werden. Bei einer Prozessierung des Polyproteins kann mit dieser Methode das VP1-spezifische Spaltprodukt erkannt werden.

Die Molekulargewichtsbestimmung des VP1-spezifischen

Proteins im Immunoblot gibt demnach Aufschluß darüber, ob eine Prozessierung des viralen Polyproteins stattgefunden hat.

Nach Expression von pPLVP1, pVP1-52 und pVP1-56c Δ (vergleiche Abb. 6 und 8) konnten VP1-spezifische Polypeptide mit Molekulargewichten von 45000, 95000 und 140000 identifiziert werden. Diese stimmen mit der Länge der konstruierten Leserahmen überein.

Dagegen konnte nach Expression von den Plasmiden pVP1-56c, pVP1- Δ BglIII-Pol bzw. pVP1-Pol (vergleiche Abb. 16) im Immunoblot nur jeweils ein VP1-spezifisches 34 kDa-Protein anstelle der eigentlich erwarteten Polypeptide mit kalkulierten Molekulargewichten von 145000, 140000 bzw. 180000 entdeckt werden. Das 34 kDa-Protein konnte aufgrund seiner antigenen Eigenschaften dem NH₂-Ende der exprimierten Polyproteine zugeordnet werden.

Das Zustandekommen des 34 kDa-Proteins durch vorzeitigen Kettenabbruch, hervorgerufen durch eine Punktmutation, konnte ausgeschlossen werden, da die Intaktheit des Leserahmens durch Subklonierung und Expression der MKSV-spezifischen DNA-Fragmente gezeigt werden konnte.

Das Auftreten des VP1-spezifischen 34 kDa-Proteins kann somit nur durch die Prozessierung der primären MKSV-spezifischen Translationsprodukte erklärt werden.

Die Prozessierung der Polyproteine findet nur bei Expression von pVP1-56c, pVP1- Δ BglIII-Pol und pVP1-Pol statt. Dies erlaubt den Schluß, daß die Prozessierung tatsächlich durch die enzymatische Aktivität einer plasmidkodierten und somit virus-spezifischen Protease katalysiert wird.

2. Genort der MKSV-Protease

Mit Hilfe der beiden Plasmide pVP1-56c und pVP1-56c Δ konnte der Genort der MKSV-spezifischen Protease festgelegt werden. Während von Plasmid pVP1-56c Δ das MKSV-spezifische Polyprotein stabil exprimiert wurde, fand bei Expression von pVP1-56c eine Prozessierung des Proteins statt. Im Vergleich zu Plasmid pVP1-56c fehlen dem Plasmid pVP1-56c Δ nur 152 MKSV-spezifische Nukleotidpaare vom 3'-Ende der insertierten MKSV-spezifischen DNA-Sequenz. Diese sind demnach für die Expression einer aktiven Virusprotease essentiell. Das läßt den Schluß zu, daß diese DNA-Sequenz für eine wichtige Domäne der Protease kodiert und somit einem Teil des Proteasegens entspricht. Eine Zuordnung dieser Nukleotidsequenz zu der Genkarte des MKSV (siehe Abb.7B) ergibt, daß das Protein P20b die virale Protease ist.

Der Genort der MKSV-spezifischen Virusprotease entspricht dem der viralen Protease bei Poliovirus (Hanecak et al., 1982) bzw. bei EMCV (Palmenberg et al., 1982).

Der mittlere Genomabschnitt, dessen Analogon bei Poliovirus nach einem Vorschlag von Korant (1979) für eine Protease kodieren soll, wurde von den Plasmiden pVP1-52 und pVP1-56c Δ exprimiert, führte aber zu keiner Prozessierung der Polyproteine. Daß dieser Bereich des viralen Polyproteins, ebenso wie der COOH-terminale Bereich, für den Ablauf der von der viralen Protease katalysierten Proteolyse nicht essentiell ist, wurde durch die Expression autokatalytisch aktiver Polyproteine von pVP1-56c bzw. pVP1- Δ BglIII-Pol gezeigt: Diese Plasmide haben Deletionen im Bereich der für das COOH-Ende des viralen Polyproteins bzw. für P52 kodierenden Sequenzen. Trotzdem zeigen die Expressionsprodukte Proteaseaktivität.

Ähnliche Ergebnisse wurden inzwischen bei der Expression der poliovirusspezifischen Protease einschließlich kurzer flankierender viraler Proteinbereiche in E. coli beschrieben

(Hanecak et al., 1984). Diese Ergebnisse bestätigen die im Rahmen dieser Dissertation erzielten und veröffentlichten Daten (Klump et al., 1984a) und zeigen, daß im Falle von Poliovirus die virale Protease durch autokatalytische Proteolyse des Expressionsproduktes freigesetzt wird. Die Prozessierung erfolgte ebenfalls unabhängig von der Expression des mittleren bzw. 3'-terminalen Genomabschnittes.

3. Zur Bakteriotoxizität MKSV-spezifischer Expressionsprodukte

Die Expression verschieden langer MKSV-spezifischer Proteinbereiche wurde durch die stufenweise Verlängerung des Leserahmens erzielt. Dabei wurde in Abhängigkeit von der Expression der einzelnen MKSV-spezifischen Polyproteine eine verschieden stark ausgeprägte Bakteriotoxizität beobachtet. Beurteilt wurde dabei der Einfluß des MKSV-spezifischen Polyproteins auf das Bakterienwachstum in Kultur und die Lebensfähigkeit der Bakterien (durch Ausstreichen von Kulturproben auf Agarplatten). Nach diesen Kriterien wurden drei Proteinbereiche ermittelt, welche in verschiedenem Maße die Zelle und ihr Wachstum beeinflussen (vergleiche Abb. 11 und 12):

i) Bei Expression von pPLVP1 tritt keine die Lebensfähigkeit der Zelle einschränkende Wirkung auf. Im Vergleich zur Expression von pPLc24 ist aber die Wachstumsrate der Bakterien verringert. Die Behinderung des Zellwachstums läßt sich hier durch eine unspezifische Wechselwirkung des Expressionsproduktes mit der Zelle erklären. Das MKSV-spezifische Polyprotein wird in großer Menge in der Bakterienzelle produziert. Aufgrund seiner starken Hydrophobizität bildet es Aggregate, die im Zellplasma ausfallen und einen großen Teil des Zellvolumens einnehmen

und zum Beispiel bei der Zellteilung stören könnten (Rowlands & Brown, 1985).

ii) Die proteolytisch aktiven MKSV-spezifischen Polyproteine wirken auf die Bakterienzelle stark toxisch. So sterben bei Expression von pVP1-56c innerhalb von 30 Minuten 99,7% der exprimierenden Bakterien ab. Die Bakteriotoxizität des MKSV-spezifischen Proteins kann durch Hemmung seiner Proteaseaktivität aufgehoben werden (Klump et al., 1984b). Dieser Proteaseeffekt könnte damit erklärt werden, daß von der viralen Protease auch zelluläre Proteine gespalten werden, was zur Inaktivierung wichtiger zellulärer Prozesse und somit zum Zelltod führt.

iii) Auch wenn der für die virale Protease kodierende Leserahmenanteil fehlt, tritt bei Expression der P52-Region eine Hemmung des Wachstums und eine Einschränkung der Lebensfähigkeit der Zellen ein, aber in geringerem Maße, als in Gegenwart der Virusproteaseaktivität (nach einer Stunde überlebten noch 10% der Bakterien). Es ist anzunehmen, daß für diese Wirkung eine enzymatische Aktivität des MKSV-spezifischen Polyproteins verantwortlich ist.

Bislang konnte dem P52-Bereich noch keine virus-spezifische Funktion zugeordnet werden. Die Existenz einer MKSV-spezifischen Phosphokinase wäre denkbar, da gezeigt werden konnte, daß die Hüllproteine im Viruspartikel phosphoryliert vorliegen (LaTorre et al., 1980) und auch eine mit dem Virion assoziierte Proteinkinaseaktivität nachgewiesen werden konnte, welche in vitro zur Phosphorylierung der Hüllproteine führte (Grubman et al., 1981).

Es wurde deshalb ein erster Versuch unternommen, die Phosphorylierung von Proteinen in E. coli während der Expression von pVP1-52 durch Zugabe von ^{32}P -Orthophosphat zum Kulturmedium nachzuweisen. Es konnte zwar der Einbau des radioaktiven Isotops in Nukleinsäure nachgewiesen werden, was die Verwertung des angebotenen Orthophosphates im Zellstoffwechsel zeigt, phosphorylierte Proteine waren jedoch nicht zu entdecken (Daten nicht gezeigt).

Die Existenz einer virus-kodierten Phosphokinase ist

trotzdem nicht auszuschließen, da die Modifizierung eines in geringer Konzentration in E. coli vorkommenden Proteins oder eine ineffizient ablaufende Phosphorylierung unterhalb der Nachweisgrenze des markierten Proteins liegen könnte. Diese könnte aber ausreichen, um die toxische Wirkung in der Zelle hervorzurufen.

4. Identifizierung der bei der Prozessierung auftretenden Spaltprodukte

Das in E. coli etablierte MKSV-spezifische Prozessierungssystem ermöglicht die Untersuchung der proteolytischen Spaltung von Vorläuferproteinen in Abhängigkeit von der viralen Protease. Es konnte gezeigt werden, daß in E. coli exprimierte MKSV-spezifische Polyproteine zu Spaltprodukten definierter Größe abgebaut werden. Eine Charakterisierung dieser Spaltprodukte sollte Aufschluß darüber geben, ob dieses Prozessierungssystem einen Vergleich mit der in vivo-Situation erlaubt. Dazu wurde überprüft, ob die Spaltstellen, die in vivo (d. h. in infizierten Zellkulturen) bzw. in vitro (in vitro-Translationssystemen) von der viralen Protease erkannt werden, auch in diesem Prozessierungssystem gespalten werden.

4.1 Nachweis der Spaltprodukte

Mit Anti-O₁K-Serum können nur Spaltprodukte mit VP1-spezifischen Antigendeterminanten nachgewiesen werden. Während nach Expression von pVP1-56c, pVP1-ΔBglII-Pol und pVP1-Pol jeweils ein VP1-spezifisches Spaltprodukt erkennbar ist, lassen sich nach Expression von pVP3-Pol mehrere Spaltprodukte im Immunoblot anfärben.

Das Plasmid pVP3-Pol besitzt zusätzlich zu der MKSV-spezifischen DNA-Sequenz von Plasmid pVP1-Pol einen Teil der dem VP1-Gen vorgesetzten VP3-kodierenden Sequenz, sodaß im primären Translationsprodukt die Spaltstelle zwischen den Hüllproteinen VP3 und VP1 für die Proteolyse zugänglich wird (siehe Abb. 23). Das Auftreten mehrerer VP1-spezifischer Spaltprodukte (58 kDa-, 41 kDa- und 28 kDa-Proteine) läßt sich durch eine partielle limitierte Proteolyse des MKSV-spezifischen Polyproteins erklären. Die entdeckten Spaltprodukte repräsentieren demnach verschiedene Zwischenstufen bzw. Endprodukte der Prozessierung.

Weitere Spaltprodukte wurden durch spezifische Isotopenmarkierung nachgewiesen (26 kDa-Protein nach Expression von pVP1-56c, vergleiche Abb. 10; 120 kDa- und 66 kDa-Proteine nach Expression von pVP1- Δ BglII-Pol, Daten nicht gezeigt), erlaubten aber nicht die Rekonstruktion eines vollständigen Prozessierungsschemas. Das Fehlen einiger MKSV-spezifischer Spaltprodukte könnte auf Abbau durch E. coli-eigene Proteasen beruhen.

Da auch nach längerer Inkubation bis zu 4 Stunden die als Zwischenprodukte identifizierten VP1-spezifischen 41 kDa- und 58 kDa-Proteine in E. coli stabil sind (nicht gezeigt), ist anzunehmen, daß die virale Protease in diesen Zellen mit kurzer Halbwertszeit inaktiviert wird.

Die Stabilität der VP1-spezifischen Spaltprodukte könnte auf der Bildung von Aggregaten beruhen, die sie für eine Degradation unzugänglich macht. Zusätzlich könnte bei NH_2 -terminalen Spaltprodukten das NH_2 -Ende der MS2-Polymerase als Schutzgruppe wirken und den Abbau durch Aminopeptidasen verhindern.

4.2 Kartierung der MKSV-spezifischen Spaltprodukte

Die VP1-spezifischen Proteine wurden anhand ihrer Molekulargewichte mit den zu erwartenden Spaltprodukten korreliert. Bei Übereinstimmung mit potentiellen Spaltprodukten würde diese Kartierung Hinweise auf die tatsächlich erkannten Spaltstellen geben. Die Auswahl der Spaltstellen stützte sich auf folgende Kriterien:

- i) Falls das in E. coli exprimierte Polyprotein eine dem viralen Polyprotein vergleichbare Konformation hat, sollten die in vivo-Spaltstellen zugänglich sein und in Gegenwart der geeigneten Proteasen gespalten werden. Alle in vivo-Spaltstellen wurden in Betracht gezogen, da nicht auszuschließen ist, daß die virale Protease neben den sekundären auch die primären Spaltungen katalysiert.
- ii) Durch Zuordnung aller Virusproteine zur Aminosäuresequenz* des MKSV-spezifischen Polyproteins ermittelten Forss et al. (1984) potentielle Spaltsequenzen für die primären und sekundären Spaltstellen des viralen Polyproteins. Als Ergebnis dieser Korrelation postulieren sie, daß am häufigsten an Glu/Gly-Sequenzen gespalten wird (6 der 12 ermittelten Spaltsequenzen sind Glu/Gly-Paare). Neben diesen 6 Glu/Gly-Spaltsequenzen treten zusätzlich 8 weitere Glu/Gly-Paare inmitten von Virusproteinen auf. Da durch eine Konformationsänderung des in E. coli exprimierten Polyproteins eine in vivo nicht gespaltene Glu/Gly-Sequenz in eine die Spaltung begünstigende Stellung versetzt werden könnte, wurden alle Glu/Gly-Sequenzen als potentielle Spaltstellen der viralen Protease bei der Zuordnung der Spaltprodukte mit berücksichtigt.

* Die Aminosäuresequenz wurde aus der bekannten Nukleinsäuresequenz der klonierten cDNA des MKSV (Stamm O₁K) abgeleitet.

Bei Berücksichtigung der VP1-Antigenpositionen und der Molekulargewichte der VP1-spezifischen Spaltprodukte von pVP1-56c, pVP1- Δ BglII-Pol, pVP1-Pol und pVP3-Pol können die Spaltprodukte unter Einbeziehung der oben beschriebenen Spaltstellen in ein Prozessierungsschema eingeordnet werden. Das 34 kDa-Protein konnte inzwischen gereinigt und sein NH₂-Ende ansequenziert werden (Einberger und Klump, unveröffentlicht). Die ersten 6 Aminosäuren der bestimmten Sequenz stimmen mit den Aminosäuren 2-7 des in E. coli von pVP1-56c exprimierten Polyproteins überein. Das 34 kDa-Protein ist somit im Prozessierungsschema als NH₂-terminales Spaltprodukt einzuordnen. Unter dieser Voraussetzung ergeben sich, wie in Abb. 25 gezeigt, die möglichen Prozessierungsschritte wie folgt:

Die in E. coli exprimierten Polyproteine werden von der viralen Protease quantitativ zwischen VP1 und P12 gespalten. Dies führt bei Expression von pVP1-56c, pVP1- Δ BglII-Pol und pVP1-Pol zu dem einzigen VP1-spezifischen 34 kDa-Protein und bei pVP3-Pol zu dem 58 kDa-Protein (Abb. 25, Zeile 5 bzw. 2). Letzteres stellt ein Zwischenprodukt dar, welches weiter prozessiert wird. Da es von allen identifizierten Spaltprodukten im Immunoblot am stärksten angefärbt wurde, kann die weitere Spaltung nur zu einem geringen Prozentsatz erfolgt sein.

Das 58 kDa-Protein wird am häufigsten in der VP3-Domäne gespalten, wobei ein VP1-spezifisches 41 kDa-Protein freigesetzt wird.

In noch geringerem Maße wird das 58 kDa-Protein zwischen VP3 und VP1 gespalten, was zur Freisetzung eines VP1-spezifischen 28 kDa-Spaltproduktes führt.

Informationen über erfolgte Spaltungen im Bereich der Nichtstrukturproteine können methodisch bedingt nur durch die Analyse VP1-spezifischer Zwischenprodukte erhalten werden, welche nach partieller Hemmung der viralen Proteaseaktivität anfallen. Das Auftreten mehrerer solcher

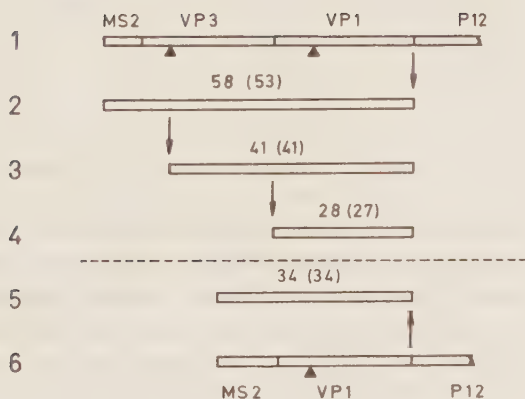


Abb. 25

Kartierung der VP1-spezifischen Spaltprodukte von pVP3-Pol, pVP1-56c, pVP1- Δ BglIII-Pol und pVP1-Pol

Der NH₂-terminale Bereich der Polyproteine von pVP3-Pol (Zeile 1) und von pVP1-56c bzw. pVP1- Δ BglIII-Pol und pVP1-Pol (Zeile 6) ist dargestellt. Das NH₂-Ende der MS2-Polymerase (MS2) und die Position der Virusproteine ist angegeben.

Die Spaltstellen sind mit Pfeilen angegeben. Die Position der Glu/Gly-Aminosäurepaare (▲) ist ebenfalls angegeben. Über den Spaltprodukten sind die im Immunoblot bestimmten Molekulargewichte angegeben, in Klammern die kalkulierten bzw. die aus Veröffentlichungen bezogenen Werte.

Zwischenprodukte (zum Beispiel bei pVP1-56c; siehe Abb. 13, Spur 3) zeigt, daß von der viralen Protease noch weitere Spaltstellen im Bereich der Nichtstrukturproteine erkannt werden. Da diese Zwischenprodukte aufgrund ihrer höheren Molekulargewichte nicht exakt kartiert werden können, ist eine Identifizierung einzelner Spaltstellen nur schwer möglich.

5. Stellt das entwickelte Prozessierungssystem ein brauchbares Modell zur Untersuchung der limitierten Proteolyse des viralen Polyproteins dar?

Die in E. coli als Bestandteil virus-spezifischer Polyproteine exprimierte MKSV-Protease katalysiert die spezifische Prozessierung dieser primären Translationsprodukte. Die Kartierung der Spaltprodukte legt nahe, daß die viruskodierte Protease das Polyprotein an drei verschiedenen Stellen im untersuchten Bereich der Hüllproteine spaltet, und zwar im Bereich der in vivo-Spaltstellen VP3/VP1 und VP1/P12 und in der VP3-Domäne.

Für die Spaltung zwischen VP1 und P12 wurden von Forss et al. (1984) zwei Spaltstellen angegeben, welche 16 Aminosäuren auseinander liegen. Die eine wurde durch Vergleich der Aminosäuresequenz des Polyproteins mit der COOH-terminalen Sequenz des aus Virionen isolierten Hüllproteins VP1 (Kurz et al., 1981), die andere durch Vergleich mit der NH₂-terminalen Sequenz von P12 bzw. P52 aus in vitro-Translationsexperimenten (Grubman, nicht veröffentlicht, erwähnt in Forss et al., 1984) abgeleitet. Als Ergebnis der Spaltungen zwischen VP3/VP1 und zwischen VP1/P12 sollte daher ein VP1-spezifisches Protein freigesetzt werden, welches entweder mit dem Hüllprotein VP1 identisch ist (bei Spaltung am COOH-Ende des VP1) oder ein um 1,7 kDa höheres Molekulargewicht (bei Spaltung am

NH₂-Ende des P12) haben sollte. Tatsächlich läßt sich ein VP1-spezifisches Spaltprodukt nachweisen, welches in der Gelelektrophorese mit dem Hüllprotein VP1 komigriert (siehe Abb. 24).

Daraus kann geschlossen werden, daß die in E. coli exprimierte virale Protease entgegen der bisherigen Annahme zumindest eine primäre Spaltstelle (Spaltung am COOH-Ende des VP1) neben den sekundären Spaltstellen (zum Beispiel die Spaltung zwischen VP3 und VP1) hydrolysiert.

Während die Hydrolyse sekundärer Spaltstellen durch die virale Protease aus in vitro-Translationsexperimenten bekannt ist (Grubman & Baxt, 1982; Burroughs et al., 1984), ist über eine durch die virale Protease katalysierte Spaltung zwischen VP1 und P12 bisher nicht berichtet worden. Bei den bisher untersuchten Picornaviren wurde postuliert, daß die primären Spaltungen durch Proteasen der Wirtszelle katalysiert werden (Korant, 1972; Palmenberg et al., 1984). Diese Hypothese stützte sich auf die Beobachtung, daß die Spaltung des viralen Polyproteins bereits während der Translation am Ribosom erfolgte. Diese Annahme schließt jedoch nicht aus, daß die virale Protease, sobald sie translatiert ist, diese Spaltungen ebenfalls katalysiert. Für Poliovirus konnte von Hanecak et al. (1982) indirekt gezeigt werden, daß die angeblich primäre Spaltung zwischen P2 und P3 von der viralen Protease hydrolysiert wird. Bei in vitro-Translation von polioviraler RNA konnte mit einem gegen die virale Protease gerichteten Antikörper die Prozessierung aller von der Virusprotease erkannter Spaltstellen im Polyprotein gehemmt werden. Dabei wurde auch die Spaltung zwischen P2 und P3 gehemmt.

Korant (1972) stellte fest, daß die zu VP1/P12 analoge Spaltstelle bei Poliovirus von unterschiedlichen wirtszell-spezifischen Proteasen (trypsin- bzw. chymotrypsinähnlichen) je nach infizierter Zelllinie gespalten wird. Da die Laufgeschwindigkeit der freigesetzten Spaltprodukte aus den verschiedenen Zelllinien bei Vergleich im SDS-Polyacrylamidgel geringfügig verändert ist, schloß

Korant, daß die wirtszell-spezifischen Proteasen zwar im gleichen Bereich, aber um ca. 10 Aminosäuren versetzt spalten. Dies würde bedeuten, daß dieser Bereich besonders gut zugänglich für Proteasen ist. Übertragen auf MKSV und das in E. coli etablierte Prozessierungssystem, würde dies erklären, warum diese Spaltstelle im Vergleich zu den anderen untersuchten Spaltstellen, zum Beispiel VP3/VP1, häufiger gespalten wird.

Dies könnte bei der Morphogenese des Virus eine Rolle spielen. P88 könnte bei der Konstruktion des Kapsids eine stabilisierende "Gerüst"-Funktion einnehmen, während die Spaltung durch die virale Protease schließlich zur Einnahme der richtigen Konformation der einzelnen Bausteine in dem Kapsid führt.

Über eine Spaltung inmitten der VP3-Domäne in vivo bzw. in vitro wurde bislang nicht berichtet. Das Prozessierungsschema legt nahe, daß die Spaltung des 58 kDa-Proteins in der VP3-Domäne an der preferentiellen Spaltsequenz Glu/Gly erfolgen könnte. Dieses Glu/Gly-Paar ist eines von 8 Glu/Gly-Paaren, welche im viralen Polyprotein sonst nicht gespalten werden. Die gefundene Spaltung an dieser Stelle läßt sich nur so erklären, daß neben der primären Spaltsequenz die Tertiärstruktur des Polyproteins für die Spaltbarkeit Ausschlag gebend ist. Unter diesem Gesichtspunkt könnte durch die Fusion der VP3-Domäne mit der MS2-Polymerase eine Konformationsänderung induziert worden sein, welche die Glu/Gly-Sequenz in der VP3-Domäne in eine für die Spaltung günstige Position bringt. Aus diesem Grunde wäre es als Vergleich interessant, in E. coli die Prozessierung von Polyproteinen zu untersuchen, welche die vollständige Folge der Hüllproteine enthalten sollten. Die VP3-Domäne sollte in diesem Fall in der in vivo-Konformation vorliegen und nicht mehr gespalten werden.

Die oben diskutierten Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Mit dem in E. coli etablierten Prozessierungssystem können drei von der viralen Protease katalysierte Spaltungen nachgewiesen werden. Obwohl die exakte Spaltsequenz in diesen drei Fällen noch nicht durch Sequenzdaten der Termini der einzelnen Spaltprodukte manifestiert werden konnte, lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

i) Die MKSV-spezifische Protease erkennt im Gegensatz zu der Poliovirusprotease, welche spezifisch nur Gln/Gly-Paare spaltet (Hanecak et al., 1982), drei verschiedene Spaltsequenzen. Dies geht aus dem Vergleich der potentiellen Spaltstellen und ihrer flankierenden Sequenzen hervor (siehe Tab. I).

ii) Die virale Protease spaltet zwischen VP3 und VP1, erkennt somit eine sekundäre Spaltstelle. Desweiteren spaltet sie im Bereich der primären Spaltstelle zwischen VP1 und P12. Es ist anzunehmen, daß diese beiden Spaltungen analog der in vivo-Situation verlaufen.

iii) Die Spaltung in der VP3-Domäne könnte an einer Glu/Gly-Sequenz erfolgen. Diese Spaltung findet in vivo nicht statt. In dem hier etablierten Prozessierungssystem läßt sich diese Spaltung durch eine geänderte Konformation des viralen Polyproteins erklären. Dies deutet darauf hin, daß die Glu/Gly-Sequenz tatsächlich ein bevorzugtes Substrat der viralen Protease darstellt.

Die Prozessierung der in E. coli exprimierten MKSV-spezifischen Polyproteine konnte durch Zugabe von Zn^{2+} -Ionen zum Kulturmedium während der Expression gehemmt werden. Dabei hemmen Zn^{2+} -Ionen die Proteolyse der einzelnen Spaltstellen im Polyprotein unterschiedlich stark (siehe Abb. 23A, Spur 3 und 4). Bei einer Zn^{2+} -Ionenkonzentration von 1 mM waren nur noch die 58 kDa- und 41 kDa-Proteine, bei einer Zn^{2+} -Ionenkonzentration von 2 mM war nur noch das 58 kDa-Protein nachweisbar. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Spaltung zwischen VP3 und VP1 bei geringeren Zn^{2+} -Ionenkonzentra-

tionen inhibiert wird als die Spaltung in der VP3-Domäne, am wenigsten aber die Spaltung zwischen VP1 und P12.

Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit Versuchen zur Hemmung der Proteolyse anderer picornaviraler Polyproteine in Zellkultur (Rhinovirus, Poliovirus und EMCV; Butterworth & Korant, 1974; Korant & Butterworth, 1976). Dort konnte die Spaltung zwischen den Hüllproteinen mit geringeren Zn^{2+} -Ionenkonzentrationen gehemmt werden, während die primären Spaltungen zwischen den Vorläuferproteinen, d. h. - übertragen auf das hier vorgestellte Prozessierungssystem - zwischen P88 und P52 (entspricht der Spaltung zwischen VP1 und P12, siehe Abb. 1), erst bei höheren Zn^{2+} -Ionenkonzentrationen gehemmt werden konnten. Korant führte dieses Phänomen auf eine durch die Zn^{2+} -Ionen induzierte Konformationsänderung des viralen Polyproteins zurück, welche besonders stark den Bereich der Hüllproteine betrifft.

Die Hemmung der Proteolyse des viralen Polyproteins mit ZnSO_4 läßt darauf schließen, daß im Reaktionszentrum der viralen Protease ein aktivierter Cysteinrest ist, der durch Komplexbildung mit Zn^{2+} -Ionen inaktiviert wird. Inzwischen haben Argos et al. (1984) die Aminosäuresequenzen* der Proteasen von MKSV, Poliovirus und EMCV mittels Computer verglichen. Sie finden einen stark konservierter Peptidbereich nahe dem COOH-Ende der viralen Protease. Alle Picornavirusproteasen enthalten in diesem Bereich ein Cystein und ein Histidin an identischen Positionen der Peptidkette, woraus geschlossen wird, daß diese Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der Katalyse einnehmen. Diese Proteasen gehören demnach zur Gruppe der Cysteinproteasen (Einteilung nach Hartley, 1960). Um dies zu überprüfen oder um zum Beispiel Proteasen mit veränderter Aktivität oder Spezifität zu entwickeln ("Enzyme-design"), könnten Mutanten durch gerichtete Mutagenese in der konservierten Region hergestellt werden. Das vorgestellte Prozessierungssystem würde sich vorzüglich dazu eignen, solche Mutanten schnell und einfach zu untersuchen.

* Die Aminosäuresequenzen wurden aus den bekannten Nukleinsäuresequenzen der klonierten Virusgenome von MKSV, Poliovirus und EMCV abgeleitet.

Bei der Untersuchung der Proteolyse der von pVP1-56c, pVP1- Δ BglIII-Pol, pVP1-Pol und pVP3-Pol exprimierten Polyproteine konnte nicht unterschieden werden, ob die Spaltungen im Bereich der Hüllproteine intramolekular oder intermolekular ablaufen, d. h. die Protease eines Vorläuferproteins nur dessen Spaltung oder auch die eines anderen Substrates katalysieren kann. Für die Beantwortung dieser Frage war es notwendig, zwei verschiedene MKSV-spezifische Polyproteine in einer Zelle zu exprimieren und deren proteolytischen Abbau zu verfolgen. Dies gelang mit Hilfe der Plasmidkonstruktion 1.11, welche zwei Expressions-einheiten enthält, die für zwei MKSV-spezifische Polyproteine (180 kDa bzw. 45 kDa) kodieren. Nur eines enthält die virale Protease (180 kDa), während das andere als zusätzliches Substrat (45 kDa) dient, da es die Spaltstelle zwischen VP1 und P12 besitzt. Es konnte gezeigt werden, daß beide Proteine von der viralen Protease quantitativ gespalten werden.

Der Nachweis eines intermolekularen Mechanismus bei der Proteolyse des MKSV-spezifischen Proteins schließt aber nicht die intramolekulare Spaltung von Vorläuferproteinen aus. Die autoproteolytische Spaltung eines EMCV-spezifischen Vorläuferproteins, bestehend aus Protease und RNA-abhängiger RNA-Polymerase, wurde von Palmenberg et al. (1982) gezeigt. Als Nachweis für den intramolekularen Mechanismus wurde die trotz Verdünnung des Vorläuferproteins weiter ablaufende Prozessierung angesehen. Diese Versuche lassen sich nur in vitro durchführen, so daß das Prozessierungssystem in E. coli dafür nicht geeignet ist.

Aus der "Trans"-Wirkung der viralen Protease kann man folgern, daß auch virusfremde Proteine gespalten werden könnten, falls sie die erforderlichen Substrateigenschaften besitzen. Die toxische Wirkung der viralen Protease ließe sich somit durch die proteolytische Spaltung von Bakterienproteinen erklären.

Die Spaltung virusfremder Proteine durch die virale Protease in mit Poliovirus infizierten Zellen wurde nun ebenfalls von Etchison et al. (1984) in Betracht gezogen. Sie können den Abbau eines 220 kDa-Proteins zeigen, welches an der Initiation der Translation zellulärer mRNAs beteiligt ist. Die Inaktivierung dieses 220 kDa-Proteins wäre eine Erklärung für die Inhibierung der zellulären Proteinsynthese in infizierten Zellen.

Wie die Diskussion der Ergebnisse zeigt, kommt das etablierte Prozessierungssystem der in vivo bzw. in vitro-Situation sehr nahe. Es stellt demnach ein geeignetes Modellsystem dar, um die proteolytische Wirkung der viralen Protease zu untersuchen.

Da die meisten Spaltprodukte im Bereich der Nichtstrukturproteine in E. coli abgebaut werden, bietet es sich an, das Prozessierungsmodell zur Untersuchung der Spaltung im Bereich der Hüllproteine weiter auszubauen. Die Expression aller Hüllproteine und deren Prozessierung durch die virale Protease könnte die Bildung von Prokapsiden erlauben. Der Nachweis dieser Virushüllen würde den Beweis dafür liefern, daß die virale Protease das Polyprotein zumindest im Bereich der Hüllproteine an den biologisch relevanten Stellen spaltet.

Wie schon erwähnt, eignet sich das Prozessierungsmodell auch dazu, die Aktivität und Spezifität der viralen Protease bzw. konstruierter Mutanten zu untersuchen. Anhand der Größe bzw. der Menge an gebildeten Spaltprodukten kann auf eine geänderte Spezifität bzw. Aktivität geschlossen werden.

Es bietet sich auch an, die Proteasen verschiedener Picornaviren auf ihre Spezifität bzw. Aktivität zu untersuchen. Ein erster Versuch zum Vergleich der MKSV-Protease mit der Protease des Cocksackie B3-Virus, eines Vertreters der Enteroviren, wurde mit dem etablierten Prozessierungsmodell unternommen. Es sollte dabei untersucht werden, ob das MKSV-spezifische Polyprotein ein geeignetes

Substrat für die Protease des Coxsackie B3-Virus darstellt. Dazu wurde in dem Expressionsplasmid pVP1-Pol das Gen für die MKSV-spezifische Protease deletiert und durch das Gen der Protease des Coxsackie B3-Virus ersetzt. Praktisch wurde dazu von Plasmid pVP1-Pol das 3'-Ende des MKSV-spezifischen Leserahmens, einschließlich des Proteasegens, deletiert und durch den entsprechenden Teil des Leserahmens des Coxsackie B3-Virus ersetzt (Coxsackie B3 cDNA-Klone wurden freundlicherweise von Dr. R. Kandolf zur Verfügung gestellt; zur Klonierung siehe Kandolf & Hofschneider, 1985). Nach Expression wurden im Immunoblot anstelle des chimären Polyproteins mit einem Molekulargewicht von 210000 VP1-spezifische Proteine mit Molekulargewichten zwischen 24000 und 140000 nachgewiesen (nicht gezeigt). Die Protease des Coxsackie B3-Virus spaltet demnach das MKSV-spezifische Polyprotein, aber an anderen Stellen als die MKSV-Protease (Freisetzung des 34 kDA-Spaltproduktes). Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Thomas et al. (1983) beschrieben. Die nach in vitro-Translation poliovirus-spezifischer RNA erhaltenen Vorläuferproteine konnten - nach Zugabe EMCV-spezifischer RNA und deren Translation - von der EMCV-Protease abgebaut werden, aber mit anderer Spezifität.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die spezifischen Aktivitäten der bislang darauf untersuchten Virusproteasen verschieden sind, obwohl die Prozessierung der viralen Polyproteine der verschiedenen Genera ähnlich verläuft.

E MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Verwendete Chemikalien und Enzyme

Antibiotika

Ampicillin	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Kanamycinsulfat	Serva
Tetracyclin/HCl	Sigma

Sonstige Chemikalien

ABTS	Sigma
Acrylamid	Serva
Agarose	Seakem
Bacto Agar	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bromphenolblau	Sigma
Cäsiumchlorid	Baker Chemicals
Cethylmethylammonium- bromid (CTAB)	Eastman, Kodak
Coomassie Brilliant Blue (Serva Blau G)	Serva
Desoxyribonukleosid- triphosphate	Boehringer
3,3'-Diaminobenzidin	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll	Pharmacia
Gelatine	Difco
Hefeextrakt	Difco

N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva
Nonidet P40	LKB
Polyvinylpyrrolidon	Serva
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
TEMED	Serva
Triton X100	Serva
Tween 20	Sigma

Restriktionsenzyme

BamHI	BRL
BglII	Boehringer
BstEII	BRL
EcoRI	Renner
HindIII	Boehringer
MstII	Biolabs
PstI	BRL

Sonstige Enzyme

alkalische Phosphatase	Boehringer
DNA-Polymerase I	NEN
DNase I	Boehringer
Klenow-Fragment	Boehringer
Lysozym	Boehringer
RNase A	Boehringer
T4-Ligase	Boehringer

Radiochemikalien

alpha ³² P-dCTP	Amersham
¹⁴ C-markierte Aminosäuren	Amersham

Alle anderen Chemikalien wurden von Merck bezogen

1.2 Bakterienstämme und Plasmide

E. coli Hb 101 (hsdR, hsdM, rec A, gal,
lac, pro, leu, rpsL)

E. coli C 600 (trp, thy, leu, his, recA)

E. coli W6 (λ) (prototropher Stamm mit
lysogenem wt- λ)

pPLc24 (Remaut et al., 1981)

pBR322 (Bolivar et al., 1978)

pcI857 (Remaut et al., 1983)

1.3 Kulturmedien und wichtige Puffer

LB-Kulturmedium	LB-Agarplatten
1 % Bactotrypton	1 % Bactotrypton
0,7 % Hefeextrakt	0,7 % Hefeextrakt
0,5 % NaCl	0,5 % NaCl
	1,4 % Bactoagar

Falls erforderlich, wurde den LB-Medien folgende Menge Antibiotika beigefügt:

Ampicillin	30 μ g/ml bei Agarplatten
	100 μ g/ml bei Flüssigmedium
Chloramphenicol	170 μ g/ml
Kanamycinsulfat	25 μ g/ml
Tetracyclin/HCl	15 μ g/ml

M9-Minimalmedium

18,7 mM NH_4Cl
 22 mM KH_2PO_4
 33 mM Na_2HPO_4
 0,2 mM CaCl_2

PBS

137 mM NaCl
 3 mM KCl
 6 mM Na_2HPO_4
 1 mM KH_2PO_4
 pH 7,2

Alle weiteren Puffer sind im Methodenteil angegeben.

1.4 Sonstiges

Nitrozellulosefilter (Porengröße 0,45 μm)	Millipore
Scintillationsreagens (Quickszint 501)	W. Zinsser
Röntgenfilm XAR 5	Kodak
DNA (aus Lachssperma)	Serva
Anti- O_1K -Serum	Geschenk von Dr. K. Strohmaier, Tübingen
Anti-Ziegen-IgG-Antikörper, Peroxidase-gekoppelt	Miles
Anti-Kaninchen-IgG-Anti- körper, Peroxidase-gek.	Miles
komplettes Freund's Adjuvant	Gibco

2. Methoden

2.1 Plasmidisolierung

2.1.1 Präparative Isolierung nach Tanaka und Weisblum

Für die präparative Isolierung von Expressionsplasmiden wurden W6-Bakterien verwendet. Sie enthalten einen lysogenen λ -Phagen mit Wildtyp-cI-Repressor.

Die anderen beschriebenen Plasmide wurden aus C600 bzw. Hbl01 isoliert.

1 Liter LB-Medium (100 μ g Ampicillin/ml) wurde mit 5 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{620nm} von 0.8-1.3 bei 28°C (W6) bzw. 37°C (C600 und Hbl01) geschüttelt. Nach Erreichen der vorgegebenen Bakteriendichte wurde zur Amplifikation der Plasmide 170 μ g Chloramphenicol/ml zu den Kulturen gegeben und anschließend weitere 12-16 Stunden geschüttelt. Die Bakterien wurden, nachdem die Kulturen in Eis abgekühlt waren, abzentrifugiert (2000 Upm, GSA-Rotor, 10 Minuten, 4°C).

Die Zellyse wurde auf Eis durchgeführt.

Dazu wurden die Sedimente in 10 ml 25%iger Sucroslösung (mit 50 mM Tris/HCl pH 7.5) suspendiert, mit 1,2 ml Lysozym-Mix (2.5 mg Lysozym/ml, 200 mM Tris/HCl pH 7.5) versetzt und 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 4 ml 0.25M EDTA pH 8.0 zupipettiert und nach weiteren 5 Minuten 15 ml Triton-Mix (2% Triton X-100, 60 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8.0) zugegeben. Nach weiteren 10 Minuten wurden die Lysate zentrifugiert (16000 Upm, SS34-Rotor, 1 Stunde, 5°C). Der klare Überstand wurde mit CsCl auf eine Dichte von 1,67 g/ml und mit einer Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Die Proteinverunreinigungen wurden mittels Zentrifugation (12000 Upm, SS34-Rotor, 30 Minuten, 15°C), abgetrennt. Die

chromosomale und die Plasmid-DNA wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt (50000 Upm, Ti60-Rotor, 40 Stunden, 15°C). Die Plasmid-DNA-Bande wurde mit einer Nadel abgezapft. Das Ethidiumbromid wurde mit n-Butanol ausgeschüttelt und das CsCl durch Dialyse gegen TES-Puffer (4 mM EDTA, 50 mM NaCl, 30 mM Tris/HCl pH 7.5) entfernt. Die Dialyseschläuche wurden durch Aufkochen in 10 mM EDTA für 30 Minuten vorbehandelt. Anschließend wurde die Probe auf 1% SDS eingestellt und zweimal phenolisiert (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1). Die wäßrige Phase wurde ohne die Interphase abgenommen, auf 0.3 M NaAc und 0.01 M MgAc₂ eingestellt, mit 2.5 Volumen abs. Ethanol gefällt und mindestens eine Stunde bei -80°C bzw. 4 Stunden bei -20°C aufbewahrt.

Nach der Zentrifugation (12000 Upm, HB-4-Rotor, 30 Minuten, -20°C) wurde das Pellet im Exsikkator getrocknet, in 250 µl 0.3 M NaAc/0.01 M MgAc₂ aufgenommen und die DNA nochmals mit Ethanol gefällt.

Die isolierte DNA wurde schließlich in TES-Puffer bei -20°C aufbewahrt.

2.1.2 Minipräparation nach Birnboim und Doly (1979)

Zellsedimente von 2 ml Übernachtskultur wurden in 100 µl Lysozym-Mix (2mg Lysozym/ml, 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 8.0) suspendiert und 30 Minuten auf Eis gestellt. Die Probe wurde durch Zugabe von 200 µl 0.2 N NaOH mit 1% SDS auf pH 12-12.5 eingestellt und nach weiteren 5 Minuten auf Eis mit 170 µl 3M NaAc-Lösung (mit Essigsäure auf pH 4.8 eingestellt) neutralisiert. Bei vorsichtiger Durchmischung bildete sich ein fädiger Niederschlag, der von der aggregierenden chromosomalen DNA herrührt. Nach einer Stunde auf Eis wurde 5 Minuten zentrifugiert und der

Überstand (400 µl) mit 1 ml vorgekühltem Ethanol gefällt. Nach der Zentrifugation wurde das Sediment mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 100 µl TE-Puffer (5 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 7.6) aufgenommen und erneut mit Ethanol gefällt. Mit dieser Methode wurden 1-3 µg Plasmid-DNA pro 2 ml Bakterienkultur erhalten. Die so isolierte DNA konnte nach RNase-Behandlung (100 µg RNase A/ml; 37°C, 30 Minuten) mit Restriktionsendonukleasen gespalten werden.

2.2 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

1-3 µg Plasmid-DNA wurde in einem 20 µl Reaktionsvolumen mit Restriktionsendonukleasen inkubiert. Um eine optimale enzymatische Aktivität zu erreichen, wurden für die einzelnen Restriktionsendonukleasen verschiedene Salz- und Temperaturbedingungen nach den Angaben der Hersteller verwendet. Zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme nach Verdau wurden die Ansätze 10 Minuten auf 65°C erhitzt.

2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten in der Größenordnung von 300-10000 bp wurden 1%ige horizontale Agarosegele benutzt. Die Proben wurden mit Probenpuffer (5 mM Harnstoff, 50% Saccharose, 10 mM EDTA, 0,1% Bromphenolblau) versetzt und unter Elektrolytlösung in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde mit TPE-Puffer (30 mM NaH_2PO_4 , 10 mM EDTA, 36 mM Tris/HCl pH 8.0) bei 5-10 V/cm durchgeführt. Je nach dem gewünschten Trenneffekt lief die Gelelektrophorese 2-6 Stunden lang. Anschließend wurde das Gel 10 Minuten in

Ethidiumbromid (10 µg/ml) gefärbt. DNA-Banden wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht von 254 nm Wellenlänge, welches das in doppelsträngige DNA interkalierte Ethidiumbromid zur Fluoreszenz anregt, sichtbar gemacht.

Agarosegele wurden sowohl präparativ als auch analytisch eingesetzt, wobei bei analytischen Gelen bevorzugt dünne Gele gegossen wurden, da diese schneller laufen und eine höhere Bandenschärfe ergeben.

2.4 DNA-Fragmentisolierung

a) aus Agarosegelen mit Elektroelution

Die nach Verdau mit Restriktionsenzymen erhaltenen DNA-Fragmente wurden in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei 4°C in TPE-Puffer durchgeführt. Die nach Färbung mit Ethidiumbromid identifizierten DNA-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in Dialyseschläuche verpackt. Da Phosphat bei der weiteren Reinigung der DNA-Fragmente stört, wurden die DNA-Fragmente mit TE-Puffer (40 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) bei 4°C und 50 mA innerhalb von 4 Stunden elektrophoretisch aus dem Agarosestück eluiert. Danach wurde für 5 Minuten umgepolt (10 mA) und anschließend die Pufferlösung mit der eluierten DNA abgenommen, die DNA mit 3 Volumina Ethanol gefällt, getrocknet und in Wasser aufgenommen.

b) aus low-melting-Agarosegel über Elutipsäule

Die DNA-Fragmente wurden im 1%igen low-melting-Agarosegel mit TE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die nach Färbung mit Ethidiumbromid identifizierten und ausgeschnittenen DNA-Banden wurden in sterile Reagenzgläser überführt. Die low-melting Agarose wurde bei 65°C geschmolzen und das zehnfache Volumen an Niedrigsalzpuffer (37°C; 0,2 M NaCl, 20

mM Tris/HCl pH 7,6 und 1 mM EDTA) zugegeben. Währenddessen wurde eine Elutipsäule mit Hochsalzpuffer (1 M NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5 und 1 mM EDTA) gespült und nach Zwischenschaltung eines Nitrozellulosefilters (0,45 μ m Porengröße) mit Niedrigsalzpuffer äquilibriert. Die DNA-Lösung wurde über die Elutipsäule gegeben, wobei die Durchflußgeschwindigkeit möglichst gering sein sollte, um eine gute Adsorption der DNA an die Säule zu gewährleisten. Anschließend wurde die Säule mit 5 ml Niedrigsalzpuffer gespült und die DNA, nach Entfernung des Nitrozellulosefilters, mit 0.4 ml Hochsalzpuffer eluiert. Über 50% der DNA konnte reproduzierbar von der Säule eluiert werden. Die DNA wurde durch Fällern mit 1 ml Ethanol konzentriert.

2.5 Abspaltung der 5'-Phosphate mit alkalischer Phosphatase

Die Abspaltung der 5'-Phosphate wurde in einigen Fällen vor Ligationen durchgeführt, um eine Selbstligation des Vektors zu verhindern. Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

0.5 μ g DNA/ μ l

50 mM Tris/HCl pH 8.0

0.1 mM EDTA

0.02 U alkalische Phosphatase/ μ g DNA

Es wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung der alkalischen Phosphatase wurde dreimal phenolisiert und die DNA anschließend zweimal mit Ethanol gefällt.

2.6 Auffüllen von 5'-überstehenden Enden

5'-überstehende Enden wurden mit Hilfe der kleinen Untereinheit (Klenow-Fragment) der DNA-Polymerase I aus E. coli aufgefüllt.

Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

50 mM Tris/HCl pH 7.5
 5 mM $MgCl_2$
 5 μg BSA/ml
 50 mM Mercaptoethanol
 0.2 mM DNA
 je 0.5 mM dNTP
 0.1 U Klenow-Fragment/pmol DNA

Die Auffüllreaktion wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde die DNA mit CTAB (0,02 M Endkonzentration, 1 Stunde im Eis) gefällt (Reitz et al., 1972) und abzentrifugiert. Die sedimentierte DNA wurde in 100 μl 1 M NaCl aufgenommen und noch zweimal mit Ethanol gefällt, wonach sie direkt in weitere Enzymreaktionen eingesetzt werden konnte.

2.7 Ligase-Reaktionen

Die Konzentration der DNA-Fragmente wurde nach der Theorie von Dugaićzyk et al. (1976) berechnet, nach der der Anteil rekombinierter, ligierter Plasmide optimiert werden kann. Die Ligationen wurden unter folgenden Pufferbedingungen mit 1 U T4-Ligase/pmol DNA durchgeführt:

60 mM Tris/HCl pH 7.6
 6 mM $MgCl_2$
 10 mM Dithiothreitol
 0.6 mM ATP

2.8 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte im Prinzip nach der Methode von Mandel und Higa (1970). 200 ml LB-KulturmEDIUM wurden mit 500 μ l einer frischen Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien wurden bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD_{620nm} von 0.6-0.8 wachsen gelassen. Bei Erreichen der gewünschten Bakteriendichte wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und sedimentiert (2000 Upm, GSA-Rotor, 20 Minuten, 0°C). Die Zellen wurden vorsichtig in 100 ml 0.1 M CaCl₂ resuspendiert und die Suspension 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Dann wurde erneut zentrifugiert, das Pellet in 60 ml 0.1 M CaCl₂ aufgenommen und nochmals 5 Minuten auf Eis stehen gelassen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 20 ml 0.1 M CaCl₂ aufgenommen und entweder sofort zur Transformation eingesetzt oder mit 10 ml 88% Glycerin versetzt und in 1-2 ml Portionen bei -20°C eingefroren.

2.9 Transformation von Bakterien

Die Plasmid-DNA, mit der die Bakterien transformiert werden sollten, wurde in 1-10 μ l Volumen vorgelegt und bei 0°C mit 200 μ l kompetenten Zellen versetzt. Nach einer Inkubation von 2 Stunden auf Eis wurden die Zellen 4 Minuten auf 28°C erwärmt. Daraufhin wurden die Zellen noch 5-10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 30 Minuten bei 28°C geschüttelt. In 50-400 μ l Portionen wurden die Bakterien dann auf Agar (1% Bactotrypton, 1% Hefeextrakt, 0.5 % NaCl, 1.4% Agar) ausplattiert. Zur Selektion transformierter Zellen wurden Agarplatten mit Antibiotikum verwendet.

2.10 Nick - Translation

Die Nick-Translation wurde zur Radioaktivmarkierung von DNA mit ^{32}P verwendet (Rigby et al., 1977), wie sie zum Beispiel für Hybridisierungen gebraucht wird. Dabei werden mit Hilfe des Enzyms DNase I in der DNA Einzelstrangbrüche erzeugt, an denen dann die DNA-Polymerase I von E. coli angreifen kann. Diese besitzt eine 3'- Exonukleaseaktivität und verdaut ausgehend von den Bruchstellen den DNA-Strang, während gleichzeitig die entstehenden Lücken vom 5'-Ende aus wieder mit Nukleotiden aufgefüllt werden. Durch Zugabe von ^{32}P -Nukleotiden kann die DNA radioaktiv markiert werden.

Die Nick-Translation wurde in 100 μl Reaktionsansatz unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

50 mM Tris/HCl pH 7.4
 5 mM Magnesiumchlorid
 32 μM dATP
 32 μM dTTP
 32 μM dGTP
 3.3 μM ^{32}P -dCTP
 0,6 $\mu\text{g/l}$ DNase I
 20 U DNA-Polymerase
 100 - 200 ng DNA

Der Ansatz wurde 2 Stunden bei 15°C inkubiert.

Die nicht eingebauten radioaktiven Nukleosidtriphosphate wurden durch CTAB-Fällung von der markierten DNA abgetrennt (die Nukleosidtriphosphate bleiben in Lösung; Reitz et al., 1972). Die Fällung wurde nach folgendem Ansatz durchgeführt:

100 μl Probe
 8 μl Kalbsthymus-DNA (3 mg/ml)
 20 μl 0.1 M CTAB

Nach einer Stunde auf Eis wurden die Proben abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Sediment in 100 μ l 1 M NaCl aufgenommen. Nach 30 Minuten Schütteln wurde die DNA mit dem 2.5fachen Volumen Ethanol gefällt, getrocknet und anschließend in 100 μ l destilliertem Wasser aufgenommen. Der Einbau der Radioaktivität wurde nach TCA-Fällung überprüft.

2.11 TCA-Fällung von DNA

Zur Bestimmung der eingebauten Radioaktivität in nick-translatierte DNA wurde diese mit TCA präzipitiert (Nukleotide bleiben unter diesen Bedingungen in Lösung). 200 μ l Stopplösung (0.15 M NaCl/0.015 M Natriumcitrat, 1% Natriumpyrophosphat, 0.1 mg/ml BSA) wurden mit 5 μ l Carrier-DNA (4mg/ml) und der zu fällenden DNA-Probe versetzt. Nach Zugabe von 20 μ l 50% TCA wurde die Probe 15 Minuten auf Eis gestellt und anschließend über einen Nitrozellulosefilter abgesaugt. Während hochmolekulare DNA an die Nitrozellulose absorbiert, werden die Nukleosidtriphosphate abgesaugt. Der Filter wurde mit vorgekühlter 10% TCA/1% Natriumpyrophosphat gewaschen und danach 15 Minuten bei 65°C getrocknet. Nach Überführung in ein Fläschchen mit 6 ml Scintillationsflüssigkeit wurde die auf dem Filter zurückgehaltene Radioaktivität bestimmt.

2.12 in situ-Koloniehybridisierung nach Grunstein und Hogness (1975)

Durch Hybridisierung mit einer spezifischen, radioaktiv markierten DNA-Probe können unter einer Vielzahl von Transformanten diejenigen herausgefunden werden, welche

diese spezifische DNA-Sequenz enthalten. Die nach Transformation erhaltenen Einzelkolonien wurden dazu mit einem Samtstempel sowohl auf Nitrozellulosefilter, welche auf Agarplatten liegen, als auch auf Replikplatten überstempelt. Wenn die Kolonien eine Mindestgröße von etwa 1 mm Durchmesser erreicht hatten, wurden die Kolonien auf den Nitrozellulosefiltern lysiert, die Replikplatten bei 4°C aufbewahrt.

Die Lyse wurde auf Whatman-Filterpapier durchgeführt, das vorher mit den einzelnen Inkubationslösungen getränkt worden war. Es wurden folgende Schritte durchgeführt:

Inkubationszeit	Inkubationslösung

8 Minuten	0.5 N NaOH
2 x 4 Minuten	1 M Tris/HCl pH 7.5
4 Minuten	0.5 M Tris/HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl
7 Minuten	0.3 M NaCl, 0.03 M Natriumcitrat

Anschließend wurden die Nitrozellulosefilter 3 Stunden bei 80°C im Vakuum zwischen Whatman-Filterpapier getrocknet. Als nächster Schritt wurden die Nitrozellulosefilter mit Kalbsthymus-DNA prähybridisiert. Die Prähybridisierung wurde 3 Stunden bei 60°C in folgender Lösung (nach Denhardt, 1966) durchgeführt:

750 mM NaCl
 75 mM Natriumcitrat
 0.035 % BSA
 0.035 % Polyvinylpyrrolidon
 0.035 % Ficoll 400
 50 mM NaH₂PO₄
 250 µg/ml Kalbsthymus-DNA

Die Kalbsthymus-DNA wurde vorher mit Ultraschall behandelt und vor der Zugabe 10 Minuten auf 106°C erhitzt, um die

DNA-Stränge aufzuschmelzen.

Nach der Prähybridisierung wurden die Filter mit der markierten Probe 12-24 Stunden bei 37°C unter folgenden Bedingungen hybridisiert:

50 % Formamid
 750 mM NaCl
 75 mM Natriumcitrat
 0.007% BSA
 0.007% Ficoll 400
 0.007% Polyvinylpyrrolidon
 20 mM Na₂HPO₄
 100 µg/ml Kalbsthymus-DNA + radioaktive DNA-Probe

Nach der Hybridisierung wurden die Filter mehrmals bei 70°C mit 300 mM NaCl/30 mM Natriumcitrat gewaschen. Anschließend wurden die Filter an der Luft getrocknet und in Frischhaltefolie eingepackt. Sie wurden zusammen mit Filmen in Kassetten gelegt. Die Filme wurden nach 1-3 Tagen entwickelt. Die positiven Klone wurden auf den Replikaplaten durch Vergleich mit den Autoradiographien identifiziert.

2.13 Temperaturinduzierte Expression

Für die Expression MKSV-spezifischer Polyproteine unter der Kontrolle des temperatursensitiven Repressors cI857 wurden E. coli C600 verwendet, welche neben dem jeweiligen Expressionsplasmid das Repressorplasmid pcI857 (Remaut et al., 1983) enthalten.

a) Kinetik

30 ml LB-Medium (42°C ; 100 μg Ampicillin/ml und 25 μg Kanamycin/ml) wurden mit 5 ml einer frischen Übernachtskultur (bei 28°C gezogen) angeimpft und bei 42°C geschüttelt. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und

i) das Wachstum der Zellen durch Messen der OD bei 620 nm bestimmt,

ii) die Proben verdünnt und auf Agarplatten mit bzw. ohne Antibiotika ausgestrichen und

iii) 2 ml-Portionen abzentrifugiert.

Die Bakteriensedimente wurden bis zur weiteren Analyse der Proteine bei -20°C aufbewahrt.

b) Expression im präparativen Maßstab

200 ml einer Übernachtskultur (bei 28°C gezogen) wurden zur Induktion der Expression mit 200 ml 56°C -warmem LB-Medium langsam verrührt, 60 Minuten unter starkem Schütteln bei 42°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Die Bakterien wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.14 Zellyse

a) für Minipräparation

Zellsedimente von 2 ml Proben wurden je nach Pelletgröße in 50-400 μl 1% SDS/PBS aufgenommen und durch Vortexen homogenisiert. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten gekocht. Die resultierende klare Lösung wurde direkt in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt. Zur Verwendung im ELISA wurde das Dodecylsulfat durch Zugabe von KCl (2-molarer Überschuß) als Kaliumsalz ausgefüllt.

b) präparativer Ansatz

Das Bakterienpellet wurde -ausgehend von dem Volumen der ursprünglichen Kultur - in 1/40 Volumen ZSC-Puffer (5 mM ZnSO_4 / 0,15 M NaCl/ 0,015 M Natriumcitrat) suspendiert und mit Lysozym 30 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Der entstehende Schleim wurde mit 1/10 Volumen DNase I-Lösung (1mg/ml) 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die resultierende Suspension wurde bis zur weiteren Fraktionierung bei -20°C eingefroren.

2.15 Isolierung MKSV-spezifischer Fusionsproteine von pPLVP1 und pPLVP3 aus Bakterienlysaten

1-2 Stunden nach Induktion der Expression von pPLVP1 bzw. pPLVP3 wurden die Bakterien pelletiert (GSA-Rotor, 20 Minuten, 5°C, 5000 Upm). Das Sediment wurde, wie in 2.14b) beschrieben, lysiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (SS34-Rotor, 20 Minuten, 5°C, 10000 Upm). In den Sedimenten befinden sich die MKSV-spezifischen Fusionsproteine.

a) Fraktionierte Eluierung:

Die Pellets wurden mit steigenden Konzentrationen (je 2x mit 1M, 2M, 4M und 6M) Harnstoff eluiert. Ab der 4M Harnstoff-Fraktion konnten die MKSV-spezifischen Fusionsproteine nachgewiesen werden. Diese Proteine wurden dabei zu 90% angereichert.

b) Eluierung aus Polyacrylamidgelen:

10 mg Protein der 6M Harnstoff-Fraktion wurden auf präparativen Polyacrylamidgelen (siehe 2.17b) aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde ein Randstreifen abgeschnitten und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Anhand des

gefärbten Streifens wurde die Proteinbande ausgeschnitten, in einen Dialyseschlauch gepackt und 4 Stunden in Eluierungspuffer (25 mM Tris/HCl, 0,1% SDS, pH 8) elektrophoretisch eluiert (bei 100 mA). Anschließend wurde der Gelstreifen entnommen, der Dialyseschlauch wieder verschlossen, und 10 Minuten bei umgepolter Spannung wieder in die Elektrolytlösung getaucht, um die DNA von der Dialyseschlauchmembran zu lösen. Die Lösung wurde entnommen und das Protein mit 4 Volumen Ethanol gefällt (2 Stunden bei -80°C). Das Protein wurde in PBS mit 0,1% SDS aufgenommen. Die Reinheit des Proteins wurde nach Elektrophorese im Gel analysiert.

2.16 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach Schaffner & Weissmann (1973) bestimmt.

2.17 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese wurde in Anlehnung an Laemmli (1970) und Marquardt et al. (1979) durchgeführt. In der SDS-Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrer unterschiedlichen Größe aufgetrennt. Durch Komplexierung mit SDS sind alle Proteine denaturiert und negativ aufgeladen und wandern zur Anode. Es wurden 13%ige Agarosegele gegossen mit einem 5%igen Sammelgel, das zur Konzentrierung der Proben dient. Die Proteine verlassen als schmale Bande das Sammelgel und werden dann im Trenngel aufgetrennt.

a) analytisches Gel:

Das Polyacrylamidgel wurde zwischen zwei Glasplatten (13 x 15 cm), die mittels Plexiglasstreifen seitlich und unten auf 1,5 mm Abstand gehalten wurden, gegossen. Die Begrenzungen wurden vorher mit Agarose von außen abgedichtet.

37 ml der Acrylamid-Lösung A (13% Acrylamid, 0,3% Bisacrylamid, 0,4 M Tris/HCl pH 8,7 und 0,1% SDS) wurden entgast und mit 192 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 30 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) versetzt, zwischen die Glasscheiben gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser abgesaugt und das Sammelgel gegossen. 15 ml der Acrylamid-Lösung B (5% Acrylamid, 0,08% Bisacrylamid, 0,4 M Tris/HCl pH 6,8 und 0,1% SDS) wurden entgast und mit 75 µl 10% APS und 12 µl TEMED versetzt und auf das Trenngel gegossen. Die Geltaschen wurden mittels eines in die Lösung des Sammelgels geschobenen Kammes geformt.

Nach der Polymerisation wurden Kamm und untere Abgrenzung herausgenommen, das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt, und im Elektrophoresepuffer (0,2 M Glycin, 0,1% SDS, 0,025 M Tris/HCl pH 8,3) bei 10 mA zur Reinigung vorlaufen gelassen.

Die Proteinproben wurden mit 1 Volumen Probenmix (0,15 M Tris/HCl pH 8,3, 20% Glycerin, 2% SDS, 1M Mercaptoethanol, 0,02% Bromphenolblau) versetzt, 5 Minuten aufgekocht und nach dem Abkühlen auf das Gel aufgetragen. Die Gele wurden über Nacht bei 150 V laufen gelassen. Die Gelelektrophorese wurde nach dem Herauslaufen des Farbmarkers abgebrochen. Das Gel wurde 10 Minuten fixiert (10% TCA, 20% MeOH), 10 Minuten gefärbt (0,1% Coomassie Brilliant Blue, 30% MeOH) und unter mehrfachem Wechseln der Lösung mit 7,5% Essigsäure/5% MeOH entfärbt.

b) präparatives Gel:

Für präparative Gele wurden 20 x 24 cm-Glasplatten und 3mm starke Abstandhalter verwendet. Damit das Gel vor der Polymerisation nicht ausläuft, ist es notwendig, die Gelkammer von innen mit Polyacrylamid abzudichten. Zur Gelfärbung nach der Elektrophorese wurden die selben Lösungen verwendet wie oben, aber die Behandlungszeiten wurden verdoppelt.

2.18 Immunologische Methoden

2.18.1 Immunoblot

Der Immunoblot wurde in Anlehnung an Towbin et al. (1979) durchgeführt. Im Immunoblot werden die Proteine direkt nach der Auftrennung im Polyacrylamidgel auf Nitrozellulosefilter transferiert. Am festen Träger werden die Proteine mit Antikörpern behandelt. Spezifische Antikörperbindung wird mittels einer Farbreaktion nachgewiesen.

a) Elektroblob

Das Gel (PAG) wurde sofort nach der Gelelektrophorese zwischen den Glasplatten herausgenommen und in das folgende Sandwich eingebaut (von Kathode zu Anode):

Schwamm/Filterpapier/PAG/NF/Filterpapier/Schwamm

Der Zusammenbau erfolgt im Elektrolyt (20 mM Tris/HCl pH 8,8, 150 mM Glyzin, 20 % Methanol).

Als Filterpapier wurde Whatman 2MM-Filterpapier verwendet. Der Nitrozellulosefilter (NF) wurde vorher im Elektrolyt gewässert.

Das Sandwich wurde zwischen 2 durchlöchernte Kunststoffplatten eingespannt und senkrecht in eine Elektroblopparatur hineingestellt.

Nach Anlegen der Spannung (30V) wandern die Proteine in Richtung Anode und bleiben am Nitrozellulosefilter haften.

Der Elektroblopp wurde 10-24 Stunden bei 3°C durchgeführt. Nach dem Proteintransfer können die Nitrozellulosefilter mehrere Wochen in einer feuchten Kammer bei 3°C bis zur Antikörperbehandlung aufbewahrt werden.

b) Behandlung der Blopps mit Antikörpern

Zuerst wurden Proteinbindungsstellen auf dem Nitrozellulosefilter durch BSA und Gelatine abgesättigt.

Der Antigennachweis wurde durch eine Kombination von zwei Antikörpern erbracht, wobei der erste Antikörper spezifisch an das nachzuweisende Antigen bindet.

Der zweite Antikörper ist gegen den ersten gerichtet (Anti-IgG-Antikörper). Er ist mit einem Enzym - in diesem Falle der Peroxidase - gekoppelt, mit Hilfe dessen enzymatischer Aktivität gebundene Antikörper lokalisiert werden können.

Es wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- (1) Absättigung des Filters mit Lösung 1, 2 x 10 Minuten
- (2) Inkubation mit Antikörper, 1 Stunde
- (3) Waschen des Filters mit Lösung 2, 3 x 15 Minuten
- (4) Inkubation mit Anti-IgG-Antikörper/Peroxidase-gekoppelt, 1 Stunde
- (5) Waschen des Filters mit Lösung 2, 3 x 15 Minuten
- (6) Waschen des Filters mit PBS, 10 Minuten
- (7) Inkubation mit DAB-Lösung im Dunkeln, 5-30 Minuten
- (8) Waschen des Filters mit 0,1 M Phosphat, pH 7,2; 2 x

Nach Behandlung wurden die Nitrozellulosefilter an der Luft getrocknet und in Klarsichthüllen aufbewahrt.

Lösungen:

Lösung 1	Lösung 2	1.Anti körper	2.Antikörper/ Peroxidase
1 %	0,25 %	0,25 %	0,25 % Gelatine
50 mM	50 mM	50 mM	50 mM Tris/HCl pH 8
150 mM	150 mM	150 mM	150 mM NaCl
5 %	0,1 %	3 %	3 % BSA
0,02 %	0,025 %	0,02 %	0,025 % NONIDET P40

PBS

DAB-Lösung

137 mM NaCl	0,05 % DAB
3 mM KCl	0,03 % H_2O_2
6 mM Na_2HPO_4	0,1 M Phosphatlösung pH 7,2
1 mM KH_2PO_4	

pH 7,2

DAB = 3,3' Diaminobenzidin

2.18.2 ELISA

Im ELISA werden spezifische Antigendeterminanten - nach Adsorption des Proteins an festes Trägermaterial, in diesem Falle die Polystyroloberfläche der Mikrotiterplatte - durch Antikörperbindung aufgespürt.

Der Antigennachweis wird durch eine Kombination von zwei Antikörpern erbracht, wobei der erste Antikörper spezifisch an das nachzuweisende Antigen bindet. Der zweite Antikörper ist gegen den ersten gerichtet (Anti-IgG-Antikörper). Er ist mit einem Enzym - in diesem Falle der Peroxidase - gekoppelt. Gebundener Antikörper wird in einer Farbreaktion - katalysiert durch die Peroxidase - sichtbar gemacht.

Die Menge gebundener Antikörper wurde photometrisch quantifiziert. Bei Verwendung von ABTS (2,2' Azino-di--(3-Ethylbenzthiazolin Sulfonsäure) Diammoniumsalz) als Substrat, wird das oxidierte Produkt bei 405 nm nachgewiesen. Die Enzymreaktion kann durch Zugabe von NaN_3 gestoppt werden.

<u>Arbeitsschritte</u>	<u>Inkubationsbedingungen</u>
1. 50 μl Extrakt/Vertiefung 100 ng/ μl	über Nacht bei 37°C
2. Extrakt absaugen	
3. 2x waschen LsgI	
4. 100 μl 3% BSA/PBS	2h bei 37°C
5. BSA-Lsg absaugen	
6. 2x waschen LsgI	
7. 50 μl 1. Antikörper-Verd.	2h bei RT
8. Verd. absaugen	
9. 5x waschen LsgII	
10. 50 μl 2. Antikörper-Verd.	1 1/2h bei RT
11. Verd. absaugen	
12. 5x waschen LsgII	
13. 2x waschen PC-Puffer	
14. 50 μl ABTS/ H_2O_2 /PC-Puffer	ca. 30' bei RT
15. 10 μl 0,06% NaN_3	
16. OD bei 405nm messen	

Lösungen:

LsgI: PBS mit 0,1% BSA und 0,5% fötalem Kälberserum

LsgII: PBS mit 0,1% BSA, 0,5% fötalem Kälberserum und 0,1% Tween 20

PC-Puffer: 0,03 M Citrat, 0,04 M Phosphat, pH 4,2

ABTS/H₂O₂/PC-Puffer: 1 mg ABTS/ml PC-Puffer mit 0,03% H₂O₂

Antikörper-Verd.: Antikörper werden in LsgI verdünnt

2.18.3 Immunisierung von Kaninchen

150 µg des nach 2.15 isolierten Fusionsproteins von pPLVP3 wurde in 500 µl PBS aufgenommen und mit 1 Volumen kompletten Freund's Adjuvant vermischt (20 x durch eine Kanüle ziehen). Das Homogenisat wurde in 2 Portionen unter die Haut des Kaninchens gespritzt. Nach 12 und 35 Tagen wurde nochmals mit je 75 µg Protein nach der selben Prozedur geimpft. Bei jeder Impfung wurden 5-20 ml Blut aus dem Ohr des Kaninchens abgenommen. Das abgenommene Blut wurde 2 Stunden stehen gelassen, dann zentrifugiert (SS34-Rotor, 3000 Upm, 5°C, 10 Minuten) und das Serum abpipettiert, portioniert und bei -20°C eingefroren.

2.19 ¹⁴C-Markierung von p_L-abhängig exprimierten MKSV-spezifischen Proteinen

Bakterienzellen von 10 ml Übernachtskultur wurden sedimentiert (5000 Upm, SS34-Rotor, 10 Minuten, 5°C) und anschließend zweimal mit M9-Medium (18,7 mM NH₄Cl/ 22 mM KH₂PO₄/ 33 mM Na₂HPO₄/ 0,2 mM CaCl₂) gewaschen. Die Zellen wurden auf 42°C vorgewärmt und in 5 ml 42°C warmem M9-Medium suspendiert. Nach einer Minute wurden ¹⁴C-markierte Aminosäuren (je 40 nmol und 10 µCi) zugegeben und

die Bakterien 10-60 Minuten geschüttelt. Die Bakterien wurden sedimentiert, in PBS/SDS aufgenommen und 10 Minuten aufgekocht. Anschließend wurden die Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und markiertes Protein durch Fluorographie sichtbar gemacht.

2.20 Fluorographie

Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit DMSO entwässert (3x 30 Minuten unter Wechseln des Lösungsmittels), 2 Stunden in einer Lösung von 26.4% PPO (2,5-Diphenyloxazol) in DMSO geschüttelt und kurz mit DMSO gespült. Das Gel wurde mit 2%iger Glycerinlösung gewässert (das PPO fällt im Gel aus) und über Nacht im Vakuum getrocknet. Das Gel wurde mit einem Film in eine Kassette gelegt. Der Film wurde nach 3-5 Tagen Exposition entwickelt.

2.21 TCA-Fällung von Proteinen

Nach in vivo- Markierung von Proteinen wurde der Einbau radioaktiver Aminosäuren nach TCA-Fällung bestimmt. Die Proteine wurden auf 300 µl Volumen mit 0,1% SDS/ 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 eingestellt und mit 60 µl 60% TCA versetzt. Die Präzipitate wurden über Nitrozellulosefilter abgesaugt. Die Filter wurden mit 6%iger TCA gewaschen und bei 65°C getrocknet. Nach Überführung in ein Fläschchen mit 6 ml Scintillationsflüssigkeit wurde die Radioaktivität gezählt.

2.22 Arbeiten mit rekombinanten Plasmiden

Alle Arbeiten mit rekombinanten Plasmiden wurden gemäß den "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in vitro neukombinierte Nukleinsäuren" im L3- bzw. im L2-Labor der Abteilung Virusforschung im Max-Planck-Institut für Biochemie ausgeführt.

F LITERATURVERZEICHNIS

Ambros, V., Baltimore, D. (1978) "Protein is linked to the 5'end of poliovirus RNA by a phosphodiester linkage to tyrosine" J. Biol. Chem. 253, 5263-5266

Bachrach, H.L. (1968) "Foot-and-Mouth Disease", Ann. Rev. Microbiol. 22, 201-244

Bachrach, H.L., Moore, D.M., McKercher, P.D., Polatnick, J. (1975) "Immune and Antibody Responses to an Isolated Capsid Protein of Foot-and-Mouth Disease Virus" J. Immun. 115, 1636-1641

Beck, E., Forss, S., Strebel, K., Cattaneo, R., Feil, G. (1983) "Structure of the FMDV translation site and of the structural proteins" Nucl. A. Res. 22, 7873-7885

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA", Nucl. A. Res. 7, 1513-1523

Black, D.N. (1975) "Proteins induced in BHK cells by infection with Foot-and-Mouth disease virus" J. Gen. Virol 26, 109-119

Black, D.N., Stephenson, P., Rowlands, D.J., Brown, F. (1979) "Sequence and location of the poly C tract in aphtho- and cardiovirus RNA" Nucl. Ac. Res. 6, 2381-2390

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Betlach, M.C., Boyer, H.W. (1977) "Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin resistant derivatives of the plasmid pMB9" Gene 2, 75-93

Boothroyd, J.C., Highfield, P.E., Cross, G.A.M., Rowlands, D.J., Lowe, P.A., Brown, F., Harris, T.J.R. (1981) "Molecular cloning of foot and mouth disease virus genome and nucleotide sequences in the structural protein genes", Nature 290, 800-802

Brooksby, J.B. (1982) "Portraits of Viruses: Foot-and-mouth disease virus" Intervirology 18, 1-23

Brown, F., Newman, J., Stott, J., Porter, A., Frisby, D., Newton, C., Carey, N., Fellner, P. (1974) "Poly(C) in animal viral RNAs", Nature 251, 342-342

Brown, F., Cartwright, B. (1963) "Purification of Radioactive Foot-and-Mouth Disease Virus" Nature 199, 1168-1170

Burroughs, J.N., Sangar, D.V., Clarke, B.E., Rowlands, D.J., Billiau, A., Collen, D. (1984) "Multiple proteases in Foot-and-mouth disease virus replication" J. Virol. 50, 878-883

Butterworth, B.E., Korant, B.D. (1974) "Characterization of the large picornaviral polypeptides produced in the presence of zinc ion" J. Virol. 14, 282-291

Caligiuri, L.A., Tamm, I. (1970) "The role of cytoplasmic membranes in poliovirus biosynthesis" Virol. 42, 100-111

Carroll, A.R., Rowlands, D.J., Clarke, B.E. (1984) "The complete nucleotide sequence of the RNA coding for the primary translation product of foot and mouth disease virus" Nucl. A. Res. 12, 2461-2472

Chatterjee, N.K., Bachrach, H.L., Polatnick, J. (1976) "Foot-and-Mouth Disease Virus RNA: Presence of 3'-Terminal Polyriboadenylic Acid and Absence of Amino Acid Binding Ability", *Viol.* 69, 369-377

Cooper, P.D., Agol, V.I., Bachrach, H.L., Brown, F., Ghendon, Y., Gibbs, A.J., Gillespie, J.H., Lonbergholm, K., Mandel, B., Melnick, J.L., Mohany, S.B., Povey, Rueckert, R.R., Schaffer, F.C., Tyrrell, D.A.J. (1978) *Picornaviridae: Second report, Intervirology* 10, 165-180

Crawford, N.M., Baltimore, D. (1983) "Genome-linked protein VPg of poliovirus is present as free VPg and VPg-pUpU in poliovirus-infected cells" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7452-7455

Denhardt, D.T. (1966) "A Membrane-Filter Technique for the Detection of Complementary DNA", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 641-646

Doel, T.R., Sangar, D.V., Rowlands, D.J., Brown, F. (1978) "A re-appraisal of the biochemical map of foot-and-mouth disease virus RNA" *J. gen. Virol.* 41, 395-404

Dugaiczky, A., Boyer, H.W., Goodman, H.M. (1975) "Ligation of EcoRI Endonuclease-generated DNA-Fragments into Linear and Circular Structures", *J. Mol. Biol.* 96, 171-184

Etchison, D., Hansen, J., Ehrenfeld, E., Ederly, I., Sonenberg, N., Milburn, S., Hershey, J.W.B. (1984) "Demonstration in vitro that eucaryotic initiation factor 3 is active but that a cap-binding protein complex is inactive in poliovirus-infected HeLa cells" *J. Virol.* 51, 832-837

Fernandez-Munoz, R., Lavi, U. (1977) "5'Termini of poliovirus RNA: Difference between virion and nonencapsidated 35S RNA" *J. Virol.* 21, 820-824

- Forss, S., Schaller, H. (1982) "A tandem repeat gene in a picornavirus" Nucl. A. Res. 20, 6441-6450
- Forss, S. (1983) "Structure and Organization of the Foot-and-Mouth Disease Virus Genome" Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
- Forss, S., Strebel, K., Beck, E., Schaller, H. (1984) "Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus" Nucl. A. Res. 12, 6587-6601
- Gorbalenya, A.E., Svitkin, Y.V., Kazachkov, Y.A., Agol, V.I. (1979) "Encephalomyocarditis virus-specific polypeptide p22 is involved in the processing of the viral precursor polypeptides" FEBS lett. 108, 1-5
- Grubman, M.J., Baxt, B., LaTorre, J.L., Bachrach, H.L. (1981) "Identification of a protein-kinase activity in purified Foot-and-Mouth Disease Virus" J. Virol. 39, 455-462
- Grubman, M.J., Baxt, B. (1982) "Translation of Foot-and-Mouth Disease Virion RNA and processing of the Primary Cleavage Products in a Rabbit Reticulocyte Lysate" Virol. 116, 19-30
- Grubman, M.J., Robertson, B.H., Morgan, D.O., Moore, D.M., Dowbenko, D. (1984a) "Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus" J. Virol. 50, 579-586
- Grubman, M.J. (1984b) "In Vitro morphogenesis of Foot-and-Mouth Disease Virus" J. Virol. 49, 760-765
- Grunstein, M., Hogness, D.S. (1975) "Colony hybridisation: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965

Hanecak, R., Semler, B.L., Anderson, C.W., Wimmer, E. (1982) "Proteolytic processing of poliovirus polypeptides: antibodies to polypeptide P3-7c inhibit cleavage at glutamine-glycine pairs" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3973-3977

Hanecak, R., Semler, B.L., Ariga, H., Anderson, C.W., Wimmer, E. (1984) "Expression of a cloned gene segment of poliovirus in E. coli: Evidence for autocatalytic production of the viral proteinase" Cell 37, 1063-1073

Hartley, B.S. (1960) "Proteolytic Enzymes" Ann. Rev. Biochem. 29, 45-72

Harris, T.J.R., Brown, F. (1976) "Location of Poly (C) Tract in RNA of Foot-and-Mouth Disease Virus" J. gen. Virol. 33, 493-501

Harris, T.J.R., Brown, F. (1977) "Biochemical Analysis of a Virulent and an Avirulent Strain of Foot-and-Mouth Disease Virus", J. gen. Virol. 34, 87-105

Harris, T.J.R. (1980) "Comparison of the Nucleotide Sequence at the 5'End of RNAs from Nine Aphthoviruses, Including Representatives of the seven Serotypes" J. Virol. 36, 659-664

Harris, T.J.R., Brown, F., Sangar, D.V. (1981) "Differential Precipitation of Foot and Mouth Disease Virus Proteins Made in Vivo and in Vitro by Hyperimmune and Virus Particle Guinea Pig Antisera" Virol. 112, 91-98

Jacobson, M.F., Baltimore, D. (1968) "Morphogenesis of poliovirus. I. Association of the viral RNA with coat protein" J. Mol. Biol. 33, 369-378

Kandolf, R., Hofschneider, P.H. (1985) "Molecular cloning of the genome of a cardiotropic Coxsackie B3 virus: Full-length reverse transcribed recombinant cDNA generates infectious virus in mammalian cells" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4818-4822

King, A.M., Sangar, D.V., Harris, T.J.R., Brown, F. (1980) "Heterogeneity of the genome-linked protein of foot-and-mouth disease virus" J. Virol. 34, 627-634

Klump, W., Marquardt, O., Hofschneider, P.H. (1984a) "Biologically active protease of foot-and-mouth disease virus is expressed from cloned viral cDNA in Escherichia coli" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3351-3355

Klump, W., Soppa, J., Marquardt, O., Hofschneider, P.H. (1984b) "Expression of the Foot and Mouth Disease Virus Protease in E. coli" in 35. Colloquium-Mosbach 1984, The Impact of Gene Transfer Techniques in Eucaryotic Cell Biology, Springer Verlag Berlin Heidelberg

Korant, B.D. (1972) "Cleavage of viral precursor proteins in vivo and in vitro" J. Virol. 10, 751-759

Korant, B.D. Butterworth, B.E. (1976) "Inhibition by zinc of rhinovirus protein cleavage: interaction of zinc with capsid polypeptides" J. Virol. 18, 298-306

Korant, B., Chow, N., Lively, M., Powers, J. (1979) "Virus-specified protease in poliovirus-infected HeLa cells" Proc. natl. Acad. Sci. USA 76, 2992-2995

Küpper, H., Keller, W., Kurz, K., Forss, S., Schaller, H., Franze, R., Strohmaier, K., Marquardt, O., Zaslavsky, V.G., Hofschneider, P.H. (1981) "Cloning of cDNA of major antigen of foot and mouth disease virus and expression in E. coli", Nature 289, 555-559

Kurz, C., Forss, S., Küpper, H., Strohmaier, K., Schaller, H. (1981) "Nucleotide Sequence and Corresponding Amino Acid Sequence of the Gene for the Major Antigen of Foot and Mouth Disease Virus", Nucl. Ac. Res. 9, 1919-1931

Laemmli, U.K. (1970) "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", Nature 227, 680-685

LaTorre, J.L., Grubman, M.J., Baxt, B., Bachrach, H.L. (1980) "The structural polypeptides of aphthovirus are phosphoproteins" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7444-7447

Lawrence, C., Thach, R.E. (1975) "Identification of a viral protein involved in post-translational maturation of the encephalomyocarditis virus capsid precursor" J. Virol. 15, 918-928

Lieb, M. (1966) "Studies of Heat-inducible Lambda Bacteriophage. I. Order of Genetic Sites and Properties of Mutant Prophages" J. Mol. Biol. 16, 149-163

Löffler, F., Frosch, P. (1897) Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I, Orig., 22, 257-259

Mandel, M., Higa, A. (1970) "Calcium-dependent Bacteriophage DNA Infection", J. Mol. Biol. 53, 159-162

Marquardt, O., Roth, H.E., Wystup, G., Nierhaus, K.H. (1979) "Binding of Escherichia coli ribosomal proteins to 23S RNA under reconstitution conditions for the 50S subunit", Nucl. Ac. Res. 6, 3641-3650

Marquardt, O. (1982) "Three Strains of European Foot-and-Mouth Disease Virus are Highly Conserved in the 3'-Termini and Highly Variable in the Genes of Two Capsid Proteins" J. gen. Virol. 59, 283-294

- Newman, J.F.E., Cartwright, B., Doel, T.R., Brown, F. (1979) "Purification and Identification of the RNA-dependent RNA Polymerase of Foot-and-Mouth Disease Virus", *J. gen. Virol.* 45, 497-507
- Palmenberg, A.C., Pallansch, M.A., Rueckert, R.R. (1979) "Protease required for processing picornaviral coat protein residues in the viral replicase gene" *J. Virol.* 32, 770-778
- Palmenberg, A.C., Rueckert, R.R. (1982) "Evidence for Intramolecular Self-Cleavage of Picornaviral Replicase Precursors" *J. Virol.* 41, 244-249
- Palmenberg, A.C., Kirby, E.M., Janda, M.R., Drake, N.L., Duke, G.M., Potratz, K.F., Collett, M.S. (1984) "The nucleotide and deduced amino acid sequences of the encephalomyocarditis viral polyprotein coding region" *Nucl. A. Res.* 12, 2969-2985
- Porter, A., Carey, N., Fellner, P. (1974) "Presence of a large poly(rC) tract within the RNA of encephalomyocarditis virus" *Nature* 248, 675-678
- Porter, A.G., Fellner, P., Black, D.N., Rowlands, D.J., Harris, T.J.R., Brown, F. (1978) "3'-Terminal nucleotide sequences in the genome RNA of picornaviruses" *Nature* 276, 298-300
- Reitz, M.S., Abrell, J.W., Trainor, C.D., Gallo, R.C. (1972) "Precipitation of Nucleic Acids with Cetyltrimethylammonium Bromide: A Method for Preparing Viral and Cellular DNA Polymerase Products for Cesium Sulfate Density Gradient Analysis", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 30-38
- Rekosh, D.M.K. (1977) "The Molecular Biology of Picornaviruses" in "The Molecular Biology of Animal Viruses, (Nayak, D.P., ed) Vol. 1, 64-110, New York: Marcel Dekker

- Remaut, E., Stanssens, P., Fiers, W. (1981) "Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the p_L promoter of coliphage lambda" *Gene* 15, 81-93
- Remaut, E., Tsao, H., Fiers, W. (1983) "Improved plasmid vectors with a thermoinducible expression and temperature-regulated runaway replication" *Gene* 22, 103-113
- Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C., Berg, P. (1977) "Labeling Deoxyribonucleic Acid to High Specific Activity in Vitro by Nick Translation with DNA Polymerase I", *J. Mol. Biol.* 113, 237-251
- Rowlands, D.J., Brown, F. (1985) "Cloning and Expression of Foot and Mouth Disease Virus Genes" in "Recombinant DNA Research and Viruses: Cloning and Expression of Viral Genes", (Becker, Y. ed.), 353-366, Martinus Nijhoff Publishing, Boston
- Rueckert, R.R., Palmenberg, A.C., Pallansch, M.A. (1980) "Evidence for a Self-Cleaving Precursor of Virus-Coded Protease, RNA-Replicase, and VPg" in "Biosynthesis, Modification, and Processing of Cellular and Viral Polyproteins", (Koch, G., Richter, D., ed.), 263-275, New York: Academic Press
- Rueckert, R.R., Wimmer, E. (1984) "Systematic Nomenclature of Picornavirus Proteins" *J. Virol.* 50, 957-959
- Sangar, D.V., Rowlands, D.J., Cavanagh, D., Brown, F. (1976) "Characterization of the Minor Polypeptides in the Foot-and-Mouth Disease Particle" *J. gen. Virol.* 31, 35-46
- Sangar, D.V., Rowlands, D.J., Harris, T.J.R., Brown, F. (1977) "Protein covalently linked to foot-and-mouth disease virus RNA", *Nature* 268, 648-650

- Sangar, D.V. (1979) "The Replication of Picornaviruses", J. gen. Virol. 45, 1-13
- Sangar, D.V., Black, D.N., Rowlands, D.J., Harris, T.J.R., Brown, F. (1980) "Location of the Initiation Site for Protein Synthesis on Foot-and-Mouth Disease Virus RNA by In Vitro Translation of Defined Fragments of the RNA" J. Virol. 33, 59-68
- Sangar, D.V., Bryant, J., Harris, T.J.R., Brown, F., Rowlands, D.J. (1981) "Removal of the genome-linked protein of foot-and-mouth disease virus by rabbit reticulocyte lysate" J. Virol. 39, 67-74
- Saunders, K., King, A.M. (1982) "Guanidine-Resistant Mutants of Aphthovirus Induce the Synthesis of an Altered Nonstructural Polypeptide, P34" J. Virol. 42, 389-394
- Schaffner, W., Weissmann, C. (1973) "A Rapid, Sensitive, and Specific Method for the Determination of Protein in Dilute Solution" Anal. Biochem. 56, 502-514
- Sellers, R.F. (1955) "Growth and Titration of the Viruses of Foot-and-Mouth Disease and Vesicular Stomatitis in Kidney Monolayer Tissue Cultures" Nature 176, 547-549
- Semler, B.L., Anderson, C.W., Hanecak, R., Dorner, L.F., Wimmer, E. (1982) "A membrane-associated precursor to poliovirus VPg identified by immunoprecipitation with antibodies directed against a synthetic heptapeptide" Cell 28, 405-412
- Strohmaier, K., Franze, R., Adam, K.-H. (1982) "Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein" J. gen. Virol. 59, 295-306

Takegami, T., Semler, B.L., Anderson, C.W., Wimmer, E. (1983a) "Membrane fractions active in poliovirus RNA replication contain VPg precursor polypeptides" *Viol.* 128, 33-47

Takegami, T., Kuhn, R.J., Anderson, C.W., Wimmer, E. (1983b) "Membrane-dependent uridylylation of the genome-linked protein VPg of poliovirus" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7447-7451

Talbot, P., Brown, F. (1972) "A Model for Foot-and-Mouth Disease Virus", *J. gen. Virol.* 15, 163-170

Tanaka, T., Weisblum, B. (1975) "Construction of a Colicin El-R Factor Composite Plasmid In Vitro: Means for Amplification of Deoxyribonucleic Acid", *J. Bacteriol.* 121, 354-362

Thomas, A.A.M., Voorma, H.O., Boeye, A. (1983) "Relationship Between Synthesis and Cleavage of Poliovirus-Specific Proteins" *J. Virol.* 48, 303-313

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354

Wimmer, E. (1982) "Genome-linked proteins of viruses" *Cell* 28, 199-201

G ABKÜRZUNGEN

Ala	Alanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre, doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CTAB	Cethylmethylammoniumbromid
Cys	Cystein
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<u>E. coli</u>	<u>Escherichia coli</u>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EMCV	Encephalomyocarditisvirus
g	Gramm
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
His	Histidin
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	Molar
mA	Milliampere

MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MKSV	Maul- und Klauenseuchevirus
mRNA	Boten(messenger)-Ribonukleinsäure
μ Ci	Mikrocurie
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometer
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OD	optische Dichte
Phe	Phenylalanin
pmol	Pikomol
Pro	Prolin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
U	Enzymeinheit (unit)
Upm	Umdrehungen/Minute
V	Volt
Val	Valin
wt	Wildtyp

LEBENS LAUF

Wolfgang Klump-Roland

Geburtsdatum	28.12.1954
Geburtsort	Berlin
Grundschulen in Berlin und München	1961-1965
Klenze-Gymnasium (math.-nat.) in München	1965-1971 1972-1974
Centralia High School, Centralia/Illinois, USA (Schüleraustausch)	1971-1972
Abitur	1974
Grundwehrdienst	1974-1975
Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München	ab 1975
Diplom-Hauptprüfung	24.7.1980
Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. P.H. Hofschneider am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried: "Einbau Maul- und Klauenseuchevirus-spezifischer Nukleotidsequenzen in den Expressionsvektor pPLVP1"	Okt. 1980- Sept. 1981
Doktorarbeit bei Prof. Dr. Dr. P.H. Hofschneider am Max-Planck- Institut für Biochemie, Martinsried	Okt. 1981- Aug. 1985
Otto-Hahn-Medaille der Max-Planck-Gesellschaft	1984
verheiratet mit Gabriele Roland	seit 31.10.1984

